Cat No. 2R-KMLJ172545r

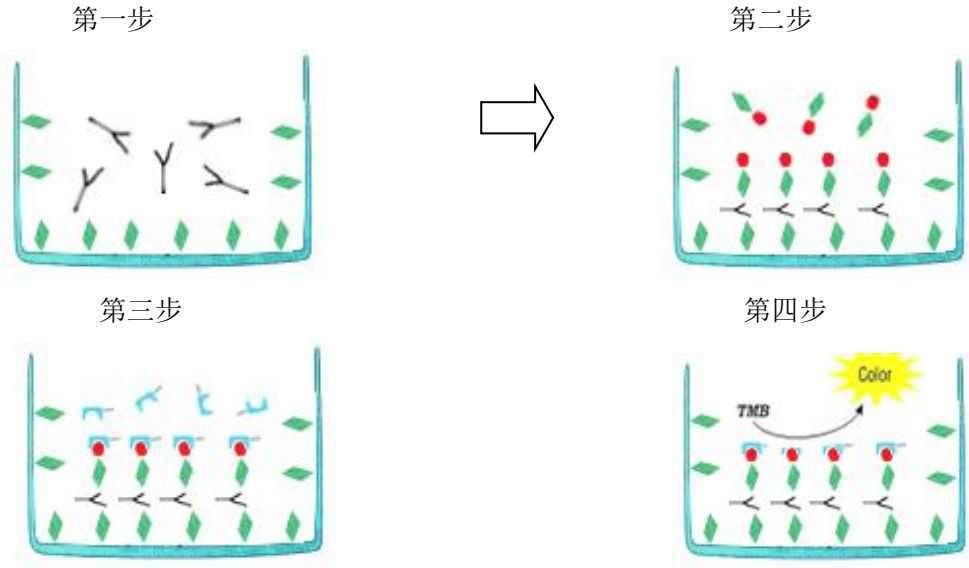
兔氧化低密度脂蛋白抗体(oxidized low density lipoprotein antibody；OLAb)ELISA 试剂盒

尊敬的客户，感谢你选用本公司的产品。本产品适用于体外定量检测兔血清、血浆或细胞培养上清液、组织等中天然和重组的 OLAb 浓度。检测其他特殊样本请咨询本公司技术支持。试剂盒仅供科研使用。 使用前请仔细阅读说明书并检查试剂盒组分。 如有疑问，请联系南京卡米洛生物工程有限公司。 您将得到我们的全方位服务。

【兔 OLAb 酶联免疫试剂盒检测原理】

本实验采用双抗原夹心 ELISA 法。所提供的 ELISA Kit 是典型的夹心法酶联免疫吸附测定试剂盒（ELISA）。预先包被的相关抗原。样品和相关抗原先后加入酶标板孔反应后，PBS 或 TBS 洗涤。随后加入过氧化物酶标记的亲和素反应；经过 PBS 或 TBS 的彻底洗涤后用底物 TMB 显色。TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色，并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的待测因子呈正相关。

【兔 OLAb 酶联免疫试剂盒检测原理示意图】



【试剂盒组成】

名称	96 Tests	48 Tests	保存条件
1．兔 OLAb 抗原包被板条	8×12	8×6	4/-20℃
2．兔 OLAb 标准品	2 支（冻干）	1 支（冻干）	4/-20℃
3．浓缩抗原	1 支	1 支	4/-20℃
4．浓缩酶结合物(ABC)	1 支	1 支	4/-20℃

www.njkmlbio.com, 邮箱：njkmljs@163.com
电话：025-52111363 52111362 传真：025-52111320

5. 酶结合物(ABC)稀释液	1 瓶	1 瓶	4/-20℃
6．抗原稀释液	1 瓶	1 瓶	4/-20℃
7．标准品稀释液	1 瓶	1 瓶	4/-20℃
8．样品稀释液	1 瓶	1 瓶	4/-20℃
9．浓缩洗涤液	1 瓶（25×）	1 瓶（25×）	4/-20℃
10．显色剂 A	1 瓶	1 瓶 (避光)	4/-20℃
11．显色剂 B	1 瓶	1 瓶	4/-20℃
12．终止液	1 瓶	1 瓶	4/-20℃
13．说明书	1 份	1 份	室温

【试验所需自备试验设备和器材】

1. 酶标仪(450nm 检测波长滤光片，570nm 或 630nm 校正波长滤光片) 。
2. 洗板机（可调注液量，保证每孔 350μl 洗液而不溢出）。
3. 超净工作台，生物安全柜，通风柜。
4. 高精度单道加液器（量程为 0.5-10μl, 2-20μl,20-200μl,200-1000μl).
5. 高精度多道加液器（8 道或 12 道，量程为 50-300μl).
6. 37℃恒温箱。
7. 低温离心机。
8. 电冰箱（4℃,-20℃,-86℃）.
9. 分析天平。
10. 剪刀，镊子，钳子等。
11. 漩涡混合仪，低频振荡器等。

【试验所需自备试验耗材及试剂】

1. 离心管（容量为 1.5ml，5ml 等）。
2. 一次性吸头（量程为 0.5-10μl, 2-20μl,20-200μl,200-1000μl）.
3. 纯净水或蒸馏水。
4. 坐标纸。
5. 吸水纸。
6. EDTA，枸橼酸钠，肝素

【标本收集注意事项】

1. 收集血液的试管应为一次性的无热原，无内毒素试管。
2. 血清和血浆避免使用溶血，高血脂标本。
3. 标本应清澈透明，悬浮物应离心去除。
4. 标本收集后若不及时检测，需按一次使用量分装，冻存于-20℃，-80℃电冰箱内，避免反复冻融。
5. 可根据标本的实际情况，做适当倍数稀释(建议做预实验，以确定稀释倍数) 。
6. 收集标本，尽量做到双份的用量，避免一次实验失败，重复实验时标本缺失，从而耽误实验进程。
7. 收集标本时，应该做好防护措施（比如戴手套，口罩，护目镜等），认为所有标本都具有一定的潜在危险性。
8. 样本处理应该在生物安全柜里面，并且正确使用生物安全柜。

【标本处理办法】

1. 血清：将采集的全血静置冰箱 4℃过夜，然后 1000-3000rpm 离心 10 分钟，取上清立即测试，暂时不测可以放入-20℃（1-3 个月）或-80℃（3-6 个月）保存。
2. 血浆：用 EDTA，枸橼酸钠，肝素等作为抗凝剂，加入血液混匀后，1000-3000rpm 离心 10 分钟，取上清立即测试，暂时不测可以放入-20℃（1-3 个月）或-80℃（3-6 个月）保存。
3. 组织匀浆：切取组织块，0.01MPBS 中过洗一次；按照 1G 组织加入 5-10ml 组织蛋白萃取试剂的比例，在冰水中匀浆。匀浆完成后，5000-10000rpm 离心 10 分钟，取上清立即测试，暂时不测可以放入-20℃（1-3 个月）或-80℃（3-6 个月）保存。
4. 细胞培养上清：1000-3000rpm 离心 10 分钟，取上清立即测试，暂时不测可以放入-20℃（1-3 个月）或-80℃（3-6 个月）保存。
5. 尿液，腹水，脑脊液等：1000-3000rpm 离心 10 分钟，取上清立即测试，暂时不测可以放入-20℃（1-3 个月）或-80℃3-6 个月）保存。

注：样品稀释的一般原则

用户须查阅相关文献了解标本内待测因子的含量，决定适当的稀释倍数，以使稀释后样品中待测因子的浓度处于 ELISA 试剂盒的最佳检测范围。样品的稀释应有详细记录。

【注意事项】

1．试剂盒使用前请保存在 2-8℃。除复溶后的标准品，其他成分不可冻结。

2．浓缩兔 OLAb 抗原，浓缩酶结合物体积小，运输中颠簸和可能的倒置，会使液体沾到管壁或瓶盖。因此使用前请用手甩几下或 1000rpm 离心 1 分钟，以使附着管壁或瓶盖的液体沉积到管底。

3．浓洗涤液可能会有结晶析出，稀释时可在水浴中加温助溶，使结晶完全溶解后再配制洗涤液。

4．测试过程中，兔 OLAb 冻干标准品为一次性使用，不得分装。因其浓度较低，溶解两小时候后，会迅速失活。

5．操作严格按照说明书进行，本试剂不同批号组分不得混用。

6．配制试剂时，要用旋涡混合仪混匀。加入孔内的试剂，充分混匀对测试结果尤为重要，最好使用微量振荡器(使用最低频率)，如无微量振荡器，可在反应前手工轻轻晃动酶标板 1 分钟，例如做圆周动作，使加入孔中的反应液混匀。

7．实验用酶标仪应严格按使用说明书规范操作，并在使用前充分预热。

8．酶免试验中兔 OLAb 标准品和样本检测时建议作复孔。

9．将不用的微孔板放进原铝箔袋中，置 2-8℃保存。

10．显色液对光敏感，因此要避免直接暴露在光线下。

11．超过使用有效日期的试剂盒不能应用于实验中。

12．试验结果判定必须以酶标仪读数为准，使用双波长检测时，波长应该设置为 450nm 和 630nm.

13．所有样品，洗涤液和各种废弃物都应按生物废弃物处理。终止液为 2M 硫酸，使用时必须注意安全。

14．各步骤加样均应使用加样器，并经常校准其准确性，以避免试验误差。一次加样时间最好控制在 5 分钟内，如标本数量多，推荐使用排枪加样。

15．每次试验测定的同时做标准曲线，最好做复孔。如标本中待测物质含量过高（样本

OD 值大于标准品孔最高浓度的 OD 值），请先用样品稀释液稀释一定倍数（n 倍）后再测定，计算时请最后乘以总稀释倍数（×n）。

16．不能检测含 NaN3 的样品，因 NaN3 抑制辣根过氧化物酶的（HRP）活性。

17．以洗板机洗板时,每孔注液量不应少于 350μl, 注意检查加样头是否堵塞。手工洗板时, 用带纸屑的吸水材料应慎重, 防止外源性过氧化物酶类似物或氧化还原物与显色剂发生反应。

18．用终止液终止反应后，请于 10 分钟内读取 OD 值。

19．进行复孔实验时，结果计算一定要求平均值。

20．标本溶血可能会有假阳性结果，因此溶血标本不宜进行此项检测。

21．试验时，应该将加过样品的板条放于密闭盒内，并保持湿度约 60%左右。

22．为保证恒温箱内的温度为 37℃，恒温箱的温度要经常校准。以确保实验温度保持恒定。

23．48T 的试剂盒，所有组分均为 96T 的 50%的量。

24．如与英文说明书有异，以英文说明书为准。

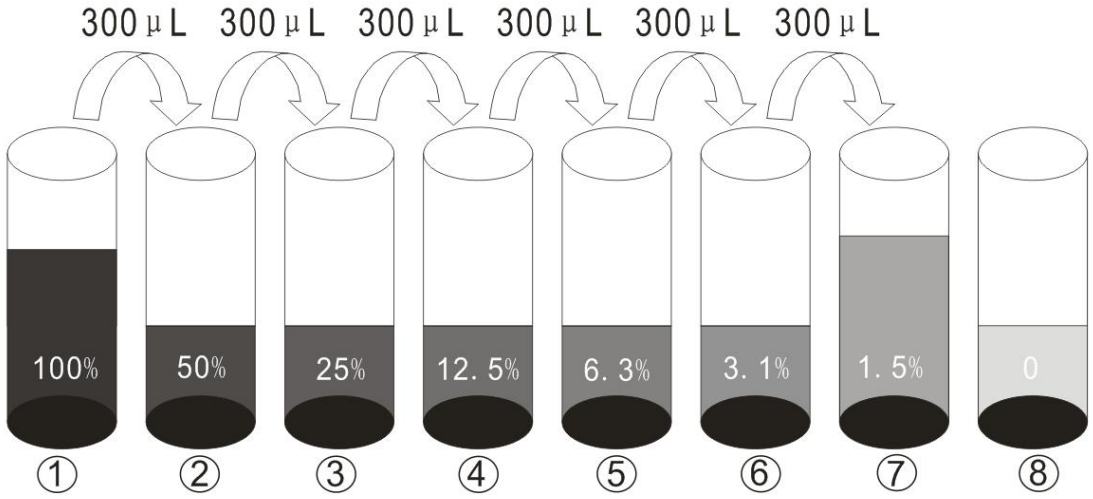
【检测前准备工作】

1. 请提前 20 分钟从冰箱中取出试剂盒，平衡至室温后方可进行试验。

2. 将浓缩洗涤液用双蒸水稀释(1:25)。未用完的放回 。

3. 兔 OLAb 标准品: 加入标准品稀释液 1.0ml 至冻干兔 OLAb 标准品中，静置 10 分钟，待其充分溶解后，轻轻混匀(浓度为 20 ng/ml)，之后在管身标注①，然后根据需要进行稀释。(建议标准曲线使用以下浓度：20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.312 ng/ml)。 注意：务必要保证冻干标准品彻底溶解和混匀。

4. 标准品稀释方法图例： 取 7 支洁净的试剂管，分别标注②,③,④,⑤,⑥,⑦,⑧. 每管加入 300μl 标准品稀释液。从第①管内取出 300μl 加入到第②管，混匀后，再从第②管取出 300μl 加入到第③管，以此类推至第⑦管。第⑧管为标准品稀释液，作为阴性对照使用。



注：复溶标准品原液（20 ng/ml）请废弃，不可重复使用。

5.兔 OLAb 抗原工作液：按当次试验所需用量，用抗原稀释液稀释浓缩抗原(1:100)，配置成抗原工作液。使用前 30 分钟准备。仅供当日使用。

6.酶结合物工作液：按当次试验所需要用量，用酶结合物稀释液稀释浓缩酶结合物(1:100)，

配置成酶结合物工作液。使用前 30 分钟准备。仅供当日使用。
7.TMB 显色工作液：在使用之前 30 分钟，按 TMB 显色液 A 9 份加 TMB 显色液 B 1 份（9：1）的比例配制 TMB 显色工作液。

【洗涤方法】

1．自动洗板机：要求注入的洗涤液为 350μl，注入与吸出间隔 20－30 秒。确保机器运用熟练后，再投入实验中使用。
2．手工洗板：每孔加洗涤液 350μl，静置 30 秒后甩尽孔内液体，在吸水纸上拍干。手工洗板时，注意加入洗液的过程中，不要造成孔间污染，从而出现跳孔的现象。

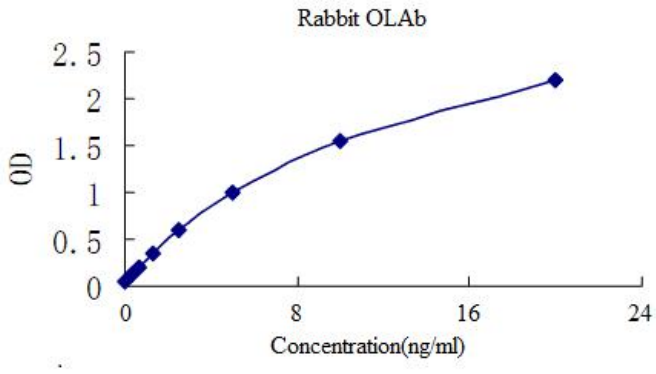
【操作步骤】

1. 从已平衡至室温的密封袋中取出试验所需板条，未用的板条和干燥剂请放回铝箔袋内封存于 2-8℃。
2. 预留空白孔（若使用双波长读板，空白孔可以不设）。
3. 分别将标本或不同浓度兔 OLAb 标准品（0ng/ml 孔加标准品稀释液）加入相应孔中(100μl/孔)，用封板胶纸封住反应孔， 37℃孵箱孵育 90 分钟。
4. 提前 30 分钟制备兔 OLAb 抗原工作液。
5. 洗板 2 次。
6. 加入兔 OLAb 抗原工作液(100μl/孔)。用封板胶纸封住反应孔，37℃孵箱孵育 60 分钟。
7. 提前 30 分钟制备酶结合物工作液。室温避光放置。
8. 洗板 3 次。
9. 除空白孔外，加入酶结合物工作液(100μl/孔)。用封板胶纸封住反应孔，37℃孵箱，避光孵育 30 分钟。
10. 洗板 5 次。
11. 加入 TMB 显色工作液（包括空白孔）100μl/孔，37℃孵箱，避光孵育，当标准曲线高浓度的颜色较深，有明显的颜色梯度的时候，即可终止。试验显色反应请勿超过 30 分钟。
12. 加入终止液（包括空白孔）100μl/孔，混匀后即刻测量 OD（450nm）值(10 分钟内)。

【结果判断】

1．每个标准品和标本的 OD 值应减去零孔的 OD 值。（若不减零孔值，标准曲线的零孔应相交于 Y 轴）
2．手工绘制标准曲线。以标准品浓度作横坐标，OD 值作纵坐标，以平滑线连接各标准品的坐标点。通过标本的 OD 值可在标准曲线上查出其浓度。推荐使用专业制作曲线软件进行分析，如 curve expert 1.3 进行结果计算。
3．若标本 OD 值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测，计算浓度时应乘以稀释倍数。

【参考曲线】



注意：本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线来计算标本含量。

【操作程序总结】

准备试剂，样品和标准品

↓

加入准备好的样品和标准品，37℃反应 90 分钟

↓

洗板 2 次，加入抗原工作液，37℃反应 60 分钟

↓

洗板 3 次，加入 ABC 工作液，37℃反应 30 分钟

↓

洗板 5 次，加入 TMB 显色液，37℃反应

↓

加入 TMB 终止液

↓

10 分钟之内酶标仪测 OD 值

↓

计算标本待测因子含量

试剂盒参数

【检测范围】20ng/ml-0.312ng/ml

【灵敏度】最小可测兔 OLAb 达 0.06ng/ml.

【特异性】系统和其它因子无交叉反应。

【批间差】≤12%.

【批内差】≤8%.

【回收率】70-110%.

【保存】-20℃ [短期内（如两周）可 4℃]

【用途】用于体外定量分析液体标本（通用型）。

【规格】96T.

【生产日期】见酶标板铝箔袋封口钢印。

【有效期】12 个月（-20℃）.

www.njkmlbio.com, 邮箱：njkmljs@163.com
电话：025-52111363 52111362 传真：025-52111320