



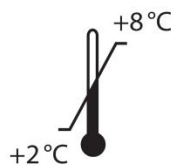
小鼠 D 丙氨酸 (D-Alanine)ELISA 检测试剂盒 (酶联免疫法)

用于体外定量检测 D-Alanine 含量

线性范围: 15.6-1000 μ mol/L



RF6882



上海瑞番生物科技有限公司

地址: 上海市嘉定区嘉罗公路 1661 弄 12 号 101 室 J1909

电话: +021-51172858

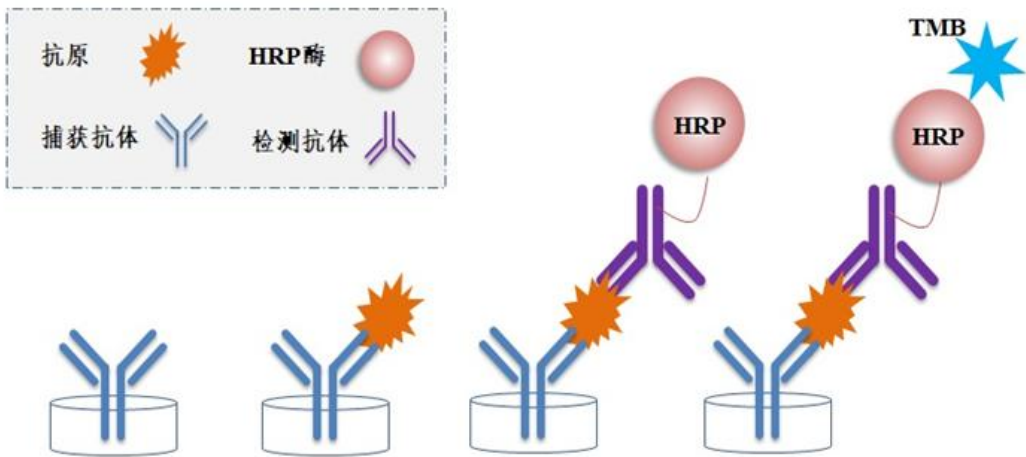
网址: www.shrfbio.com

1. 预期用途

本试剂盒设计用于定量检测血清、血浆、组织匀浆、细胞上清、细胞裂解物等样本中的 D-Alanine 浓度，仅供研究使用，不得用于医学诊断。

2. 检测原理

试剂盒采用双抗体夹心法原理：将捕获抗体包被于酶标板上，捕获样品及校准品中待测物，加入辣根过氧化物酶标记的酶标二抗，结合形成“抗体-抗原-抗体-HRP”免疫复合物，加入 TMB 显色后，若样本中有待测物则显蓝色，加入终止液停止反应。检测过程中游离的成分均被洗去，用酶标仪在 450 nm 处测 OD 值，颜色的深浅和样品中的待测物含量呈正比，通过绘制标准曲线计算出样本中待测物的浓度。



3. 包含的实验材料实验材料

名 称 Label	组成成分 Kit Components	数量 (48T) Quantity	数量 (96T) Quantity
酶标板	预包被捕获半抗原的酶标板	8×6 条	8×12 条
校准品 (10×)	待测靶抗原 (1000μmol/L)	1 支×100μL	1 支×200μL
酶标抗体 (100×)	HRP 酶标记的检测抗体	1 支×50μL	1 支×100μL
通用稀释液	样品/校准品/酶标抗体通用稀释液	1 支×15mL	1 支×25mL
浓缩洗液 (20×)	20 倍浓缩洗液	1 支×15mL	1 支×25mL
显色剂	TMB、过氧化氢	1 支×6mL	1 支×10mL
终止液	稀硫酸、抗沉淀剂	1 支×3mL	1 支×6mL

如需单独采购通用型组分，请提供对应的组分名称。

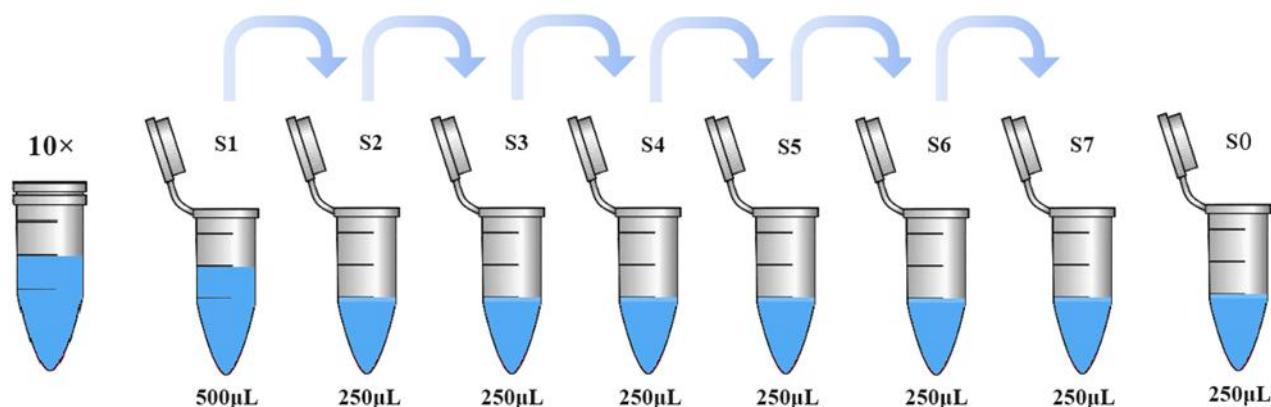
4. 需要但未包含的实验材料

- 蒸馏水或去离子水，一次性离心管、一次性手套等耗材；
- 移液器、多通道移液器及配套枪头；
- 烧杯、量筒、试剂瓶等容器具；
- 用于封贴微孔板的封板膜或其他替代材料；
- 微孔板振荡器（如有需要）、离心机、旋涡振荡器等辅助设备；

- 恒温培养箱、恒温水浴箱、酶标仪、洗板机。

5. 试剂的准备及储存

- 试剂盒各组分应储存于 **2~8℃** 保存；
- 使用前请确保试剂盒按规定的条件储存，每次实验仅准备所需实验用量的试剂，试剂盒最多可以使用 3 次；
- **校准品开封前应离心 30 秒**，确保所有校准品集中于底部；
- **1×洗液的配制**：浓缩洗液（20×）如有晶体析出，需在 37℃ 下加热至晶体全部溶解后使用。用蒸馏水 1:20 稀释，例如：10mL 浓缩洗涤液加入 190mL 的蒸馏水，混合均匀。配制好的洗液可以在 2~8℃ 保存 1 周；
- **校准品的配制**：准备 7 个试管，先将 10× 校准品按需吸取一定量用“通用稀释液”稀释 10 倍配制成检测线性范围上限校准品 S1。（例：50uL 的校准品（10×）+450uL 的“通用稀释液”，制备得到 500 μL 的 S1 浓度校准品）。随后在 6 个离心管中分别加入 250 μL 的“通用稀释液”，在这 6 个试管中（S2~S7）将 S1 校准品依次倍比稀释 6 个梯度至 S7，共配制 7 个浓度的校准品，依次为：S1、S2、S3、S4、S5、S6、S7，如下图所示，“通用稀释液”作为零浓度校准品 S0。



1×酶标抗体工作液的配制：（100×）酶标抗体工作液用“通用稀释液”按 1:100 倍稀释，例如：10uL 的（100×）酶标抗体加入 990uL 的“通用稀释液”，混合均匀。配制好的 1×酶标抗体工作液可以在 2~8℃ 保存 8h。

6. 样品采集、预处理及储存

下面列出的样品收集和储存条件旨在作为一般性指导，不同类型样品的储存、使用稳定性尚未完全评估。

- **血清**：使用血清采集管采集全血，室温静置待血细胞凝集后取的血清，或直接在 1000×g 下离心 15 分钟取得血清。操作应柔和，避免溶血发生。获取的血清应及时进行检测，如不能及时进行检测，应等分为多份，储存在 -20℃ 及以下温度条件，储存时间不超过 6 个月，冷冻储存血清样品冻融不超过 2 次。
- **血浆**：使用 EDTA 或肝素采血管收集血浆。全血采集后以 1000×g 离心 15 分钟取得血浆。操作应柔和，避免溶血发生。获取的血浆应及时进行检测，如不能及时进行检测，应等分为多份，储存在 -20℃ 及以下温度条件，储存时间不超过 6 个月，冷冻储存血浆样品冻融不超过 2 次。
- **组织**：用预冷的 PBS（0.01M，pH=7.4）冲洗组织，称重后将组织剪碎。将剪碎的组织加入裂解液，一般按 1:9 的重量体积比，比如 1g 的组织样品对应 9mL 的裂解液，具体可根据实验需要适当调整，裂解液应加入蛋白酶抑制剂，于冰上对匀浆液进行超声破碎，或反复冻融。最后将匀浆液于 5000×g 离心 5-10 分钟，取上清检测。
- **细胞**：取适量细胞，于冰上进行超声破碎，5000×g 离心 5-10 分钟，取上清检测。

- **细胞上清：**取细胞上清于 5000×g 离心 5-10 分钟，取上清检测。

7. 实验步骤

使用前将所有试剂置于室温平衡 30 分钟左右，也可置于 37℃温箱快速回温至室温。

注意：酶标板未恢复室温前，请勿开封。

1	校准品孔每孔加入 100μL 校准品 S0-S7
2	待测样品孔每孔加入通用稀释液 50uL，再加入样品 50uL。（样品稀释 2 倍*）
3	盖上封板膜，在 37℃下孵育 60 分钟。
4	洗板 5 次，最后一次洗板后弃去残留洗液，倒扣酶标板，在干净的吸水纸上拍干。
5	每孔加入 100μL 预先配制好的 1×酶标抗体工作液。
6	盖上封板膜，在 37℃下孵育 60 分钟。
7	洗板 5 次，最后一次洗板后弃去残留洗液，倒扣酶标板，在干净的吸水纸上拍干。
8	每孔加入 100μL 显色液
9	37℃下避光孵育 15 分钟。
10	每孔加入 50μL 终止液。
11	使用酶标仪在 450nm 检测波长及 620~690nm 参比波长条件下测定吸光度值，如果没有参比波长则仅选择 450nm 波长进行检测。如果最高浓度校准品 OD 值过高，应立即在 405/630nm 双波长条件下检测。

*如样本珍贵量少，可适当加大稀释倍数。

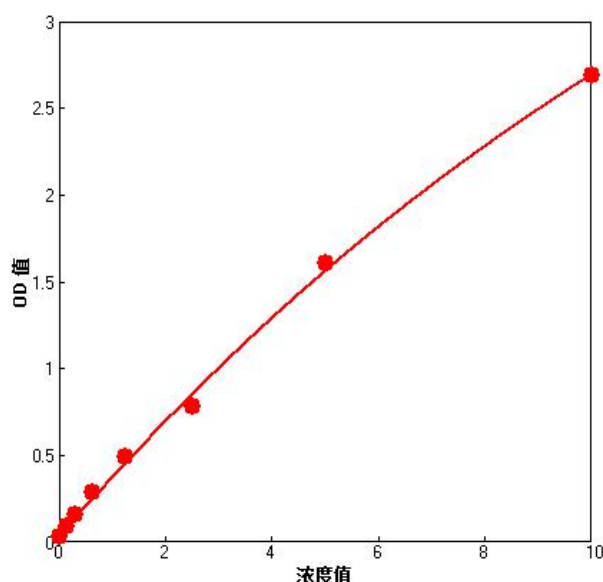
8. 结果计算

使用专业化软件进行结果拟合和计算，如 ELISACALC、SPSS、Graphpad Prism 等。以浓度值为横坐标，吸光度值为纵坐标，四参数逻辑（4-P）曲线拟合。

注意事项： 样本浓度应当乘上稀释倍数。

示例数据

以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验数据建立标准曲线。



9. 检测的局限性

样本浓度超出检测范围上限时，应当进行适当加大稀释倍数后再次检测，计算结果应当乘上稀释倍数。样本浓度低于 LOQ 定量限时，检测结果无法进行准确定量。

10. 产品性能指标

以下结果基于校准品的浓度值实验得出，未纳入基质效应等其他因素的潜在影响。

灵敏度：6.8 μ mol/L

线性范围：15.6-1000 μ mol/L

精密度：板内精密度 CV<10% (N=20)，板间精密度 CV<15% (N=20)。

特异性 (Analytical specificity)：其他相关因子在稀释缓冲液中制备为 10 μ g/mL 测定，没有观察到明显的交叉反应。

11. 注意事项

- 试剂盒内所有成分 **仅供研究使用!**
- 终止液含稀硫酸，具有腐蚀性，应谨慎操作。
- 试剂盒成分含防腐剂、蛋白成分等，可能引起皮肤过敏反应，应佩戴口罩避免吸入薄雾。
- 显色剂、浓缩洗液可能引起皮肤、眼睛和呼吸道刺激，应佩戴口罩避免吸入薄雾。
- 佩戴防护手套、防护服、眼睛和面部防护用品，实验操作后彻底洗手。

12. 技术要点

- 不同批次的试剂盒不能混用，不建议将不同板上的微孔板条组装在一块板上检测，尽管是同一批次试剂，也可能存在板与板之间的差异。
- 每次实验时应当始终配制标准曲线平行检测，不能将上一次的标准曲线用于下一次实验结果的计算。
- 不要使用超过有效期的试剂盒进行检测。
- 底物显色剂应当为无色，如变蓝表明已变质，不能应用于实验。
- 使用适当的封板膜密封微孔板条，以便检测结果更加可靠。
- 操作时尽量避免产生气泡。不要将不同试剂瓶的瓶盖交叉使用。

- 应当遵循说明书的操作进行实验，不按照说明书的操作将导致实验结果的变化，任何不遵循说明书的实验操作应当事先询问售后技术支持的建议。否则我们不保证实验结果的可靠。
- 文献支持
- 【文献标题】An Integrated Modular Vaccination System for Spatiotemporally Separated Perioperative Cancer Immunotherapy 【出版期刊】Advanced Materials