高香草酸(HVA)酶联免疫吸附测定试剂盒

HVA(Homovanillic Acid) ELISA Kit

Catalog NO.：RE10119

使用前请仔细阅读说明书，如有任何问题，可以通过以下方式联系我们：

销售部电话：02765316809

技术部电话：15342250750

电子邮箱（技术）：service@reedbiotech.com

官方网站：www.reedbio.cn

试剂盒的质保时间以及保存温度可见试剂盒外侧标签，请在保质期内使用试剂盒，联系时需要提供产品批号（见试剂盒侧面标签），以便我们更高效地为您服务。

用途

该试剂盒用于体外定量检测 Universal 血清、血浆或其它相关生物液体中 HVA 浓度。

基本性能

灵敏度	0.97 ng/mL
检测范围	3.13-200 ng/mL
特异性	可检测样本中的 HVA，且与其它类似物无明显交叉反应
重复性	板内以及板间精密度均 < 10%

检测原理

本试剂盒采用竞争 ELISA 法。用 HVA 抗原包被于酶标板上，实验时样品或标准品中的 HVA 与包被的 HVA 竞争生物素标记的抗 HVA 单抗上的结合位点，游离的成分被洗去。加入辣根过氧化物酶标记的亲和素，生物素与亲和素特异性结合而形成免疫复合物，游离的成分被洗去。加入显色底物(TMB)，TMB 在辣根过氧化物酶的催化下呈现蓝色，加终止液后变成黄色。用酶标仪在 450nm 波长处测 OD 值，HVA 浓度与 OD450 值之间呈反比，通过绘制标准曲线计算出样品中 HVA 的浓度。

试剂盒使用注意事项

1. 本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断。

2. 试验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。特别是检测血液或者其他体液样品时，请按国家生物试验室安全防护条例执行。

3. 刚开启的酶标板孔中可能会有少许水样物质，此为正常现象，不会对实验结果造成任何影响。

4. 实验中所用的 EP 管和吸头均为一次性使用，严禁在不同的液体之间混用！否则将影响实验结果。

5. 请勿使用过期的试剂！试剂盒如果分次使用，请根据需要量配制各组分，以免配制过多造成浪费而影响后续实验。建议保存酶标板框，剩余板孔放回铝箔袋中，并确保在保质期内使用完毕。

6. 请勿使用其他批号或其他来源的试剂混合或替代本试剂盒中的试剂。

7. 请勿重复使用已稀释过的标准品、生物素化抗体工作液、酶结合物工作液；已溶解的最高浓度的标准品工作液可在-20℃保存半个月，但不可反复冻存使用。

8. 在实验中标准品和样本检测时建议做复孔检测。

9. 检测使用的酶标仪需要安装能检测 450±2 nm 波长的滤光片，光密度范围在 0-3.5 之间。建议使用时提前 15 分钟预热。

试剂盒组成及保存

未拆封的试剂盒可在 2-8 ℃保存 6 个月；如果开封使用后，请按照下表中的条件分别保存各组分。

组分名称	规格	使用后保存条件
ELISA 酶标板 (Micro ELISA Plate)	96T:8 孔×12 条 48T:8 孔×6 条 24T:8 孔×3 条	-20°C,可存放 6 个月
冻干标准品 (Reference Standard)	96T:2 支 48T:1 支 24T:1 支	
浓缩生物素化抗体 (Concentrated Biotinylated Detection **Ab**) (100X)	96T:1 支 60μL 48T:1 支 60μL 24T:1 支 60μL	
浓缩 **HRP** 酶结合物 (Concentrated **HRP** Conjugate) (100X)	96T:1 支 120μL 48T:1 支 60μL 24T:1 支 60μL	-20°C,可存放 6 个月
标准品&样品稀释液 (Reference Standard & Sample Diluent)	20mL*1 瓶	2-8°C,可存放 6 个月
生物素化抗体稀释液 (Biotinylated Detection Ab Diluent)	13mL*1 瓶	
酶结合物稀释液 (HRP Conjugate Diluent)	13mL*1 瓶	
浓缩洗涤液 (Concentrated Wash Buffer) (25X)	30mL*1 瓶	
底物溶液 (Substrate Reagent)	10mL*1 瓶	2-8°C（避光）
反应终止液 (Stop Solution)	10mL*1 瓶	2-8°C,可存放 6 个月
封板覆膜	5 张	常温
产品说明书	1 份	
质检报告	1 份	

温馨提示：所有试剂瓶盖须旋紧以防止蒸发和微生物的污染。试剂体积以实际发货版说明书为准。相关试剂在分装时会比标签上标明的体积稍多一些，请在使用时量取而非直接倒出。

试验所需自备物品

1. 酶标仪(450 nm 波长滤光片)(使用仪器前提前预热)
2. 高精度移液器,EP 管及一次性吸头:0.5-10μL, 2-20μL, 20-200μL, 200-1000μL
3. 37°C恒温箱
4. 双蒸水或去离子水
5. 吸水纸
6. 加样槽

样品收集方法

1. 血清：全血样品于室温放置 1 小时或 2-8℃过夜后于 2-8℃，1000×g 离心 20 分钟，取上清即可检测。

2. 血浆：使用含抗凝剂的采血管收集样品，样品收集后 30 分钟内于 2-8℃，1000×g 离心 15 分钟，取上清即可检测。

3. 细胞培养上清：收集液体后于 2-8℃，1000×g 离心 20 分钟，除去杂质及细胞碎片。取上清检测。

4. 其它类型的样本：具体处理方式详见 http://www.reedbio.cn/view/103.html

收集样本注意事项

① 收集血液的试管应为一次性无热原无内毒素试管。全血样本不可直接冻存，需制备成血清或者血浆的形式进行检测或冻存。

② ELISA 实验可使用常见抗凝剂如 EDTA 钠盐及钾盐、肝素盐等收集血浆样本。然而，对于其它实验如生化实验等，实验者需自行评估抗凝剂的影响。

③ 样品收集后若在 1 周内进行检测可保存于 2-8℃，若不能及时检测，请按一次使用量分装，冻存于-20℃(1 个月内检测)，或-80℃(3 个月内检测)，避免反复冻融。在检测前，冷冻过的样本应缓慢地融化并离心除去冻融过程产生的沉淀物。室温混匀后使用。

④ 请勿使用含表面活性剂（如 SDS 等）或有机试剂（如甲醇等）的裂解液制备组织匀浆、细胞提取液或其它类型样本。

⑤ 某些重组蛋白可能与试剂盒中捕获或检测抗体不匹配而出现不能检测的情况。

样本检测方案

1. 建议实验者使用新鲜样本，避免因保存时间过长导致蛋白降解或变性，影响实验结果。

2. 本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用该试剂盒所造成的样本消耗负责，请实验者使用前充分考虑到样本的可能使用量，预留充足的实验样本。

3. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围，建议查阅文献、预实验或咨询技术支持等方式，预估您所检测样本中待测物的浓度。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。

4. 若所检样本不在说明书所列样本之中，建议做预实验验证其检测有效性并注意留存样本。

5. 如果您的检测样本需要稀释且稀释倍数高，建议参考通用稀释方案（详见 http://www.reedbio.cn/view/104.html）。

检测前准备工作

1. 提前 20 分钟从冰箱中取出试剂盒，平衡至室温(18-25°C)。如果试剂盒需分多次使用，请仅取出本次实验所需的酶标板条和试剂，剩余板条和试剂需按照指定条件保存。

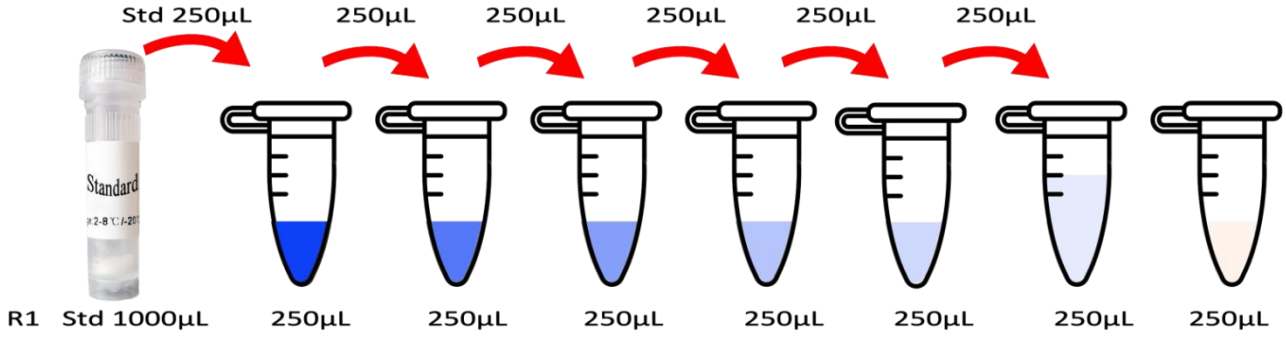
2. 洗涤液：将浓缩洗涤液用双蒸水稀释(1:24)。提示：从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶，属于正常现象，可用 40°C水浴微加热使结晶完全溶解后再配制洗涤液。当日使用。

3. 标准品工作液：

① 离心：将标准品 10000×g 离心 1 分钟。

② 加标准品&样品稀释液 1mL 至冻干标准品中，旋紧管盖，静置 10 分钟，上下颠倒数次，待其充分溶解后，轻轻混匀，避免起泡，即为 200ng/mL 的标准品工作液。

③ 倍比稀释：取 7 支 EP 管，每管加 250μL 标准品&样本稀释液（可根据实际用量来稀释，如 500μL/管）。从 200ng/mL 标准品工作液吸取 250μL 至第一管，混匀得到 100ng/mL 标准品工作液，依此逐步稀释至倒数第二管。最后一管则作为空白孔，不需要再从倒数第二管中吸取液体。标准品工作液需现配现用。



200	100	50	25	12.5	6.25	3.13	0
ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL

4. 生物素化抗体工作液：实验前计算当次实验所需用量(以 50μL/孔计算)，实际配制时应多配制 100-200μL。使用前 15 分钟，将浓缩生物素化抗体于 800×g 离心 1 分钟，以生物素化抗体稀释液将 100×浓缩生物素化抗体稀释成 1×工作浓度(例如：10μL 浓缩液+990μL 稀释液)。现配现用。

5. HRP 酶结合物工作液：HRP 酶结合物为 HRP 酶结合亲和素。实验前计算当次实验所需用量(以 100μL/孔计算)，实际配制时应多配制 100-200μL。使用前 15 分钟，将浓缩 HRP 酶结合物于 800×g 离心 1 分钟，以酶结合物稀释液将 100×浓缩 HRP 酶结合物稀释成 1×工作浓度(例如：10μL 浓缩液+990μL 稀释液)。现配现用。

6. 洗涤方法可分为两种，实验者可根据实验室条件进行实验操作。

① 手工洗板：每孔加洗涤液 300μL，浸泡 30 秒后甩尽液体，在洁净的吸水纸上拍干。

② 自动洗板机：参考北京拓普 DEM-3 型洗板机参数设置：2 点吸，每孔加入洗涤液 300μL，振板 5 秒，吸液 0.5 秒。

7. 实验操作温馨提示

① 加样时将样品加于酶标板底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀，避免产生气泡。加样时间宜控制在 10 分钟内。

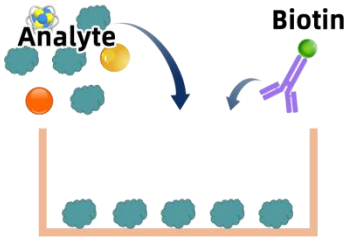
② 洗板步骤完成后请立即进行下步操作，不要让微孔板干燥。

③ 加底物溶液孵育后，实验者可根据实际显色情况酌情缩短或延长，但不可超过 30 分钟。当标准孔出现明显梯度时(前 4 个显色孔出现明显蓝色梯度)，即可终止。

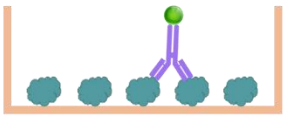
④ 终止液的加入顺序应尽量与底物溶液的加入顺序相同。

⑤ 酶标仪如果可以选择校正波长，则设置为 630 nm 或 570 nm。并从 450 nm 的读数中减去 630 nm 或 570 nm 的读数，这种方式可以获得更准确的检测结果。

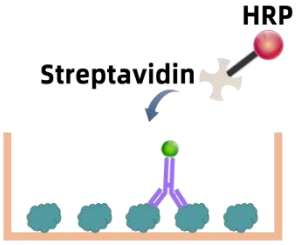
简要实验操作流程图



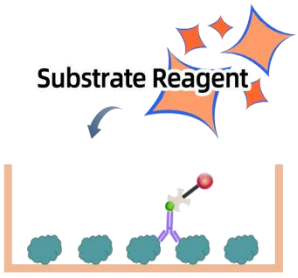
1、对应板孔内加入50μL标准品工作液或样本，立即每孔加入50μL生物素化抗体工作液，混匀，37°C孵育 30 分钟



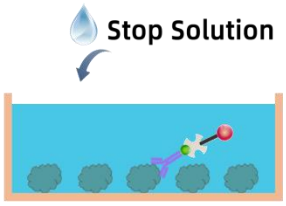
2、弃掉板内液体，洗板3次



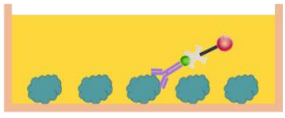
3、每孔加入100μL HRP酶结合物工作液37°C孵育30分钟，弃掉板内液体，洗板3次



4、每孔加入100μL　TMB底物溶液，37°C避光孵育15分钟



5、每孔加入50μL 终止液



6、立即在 450nm 波长下读数，处理数据

详细实验操作步骤

1. **设孔加样：**分别设定标准孔、空白孔和样本孔。标准孔加入 **50μL** 倍比稀释的标准品，空白孔加入 **50μL** 标准品&样本稀释液，其余孔加入 **50μL** 待测样本。

2. **加生物素化抗体：**立即每孔加入配好的生物素化抗体工作液 **50μL**。给酶标板覆膜，**37°C**孵育 **30 分钟**。甩尽孔内液体，在洁净的吸水纸上拍干。

3. **洗板：**加洗涤液 **300μL**/孔，浸泡 **30 秒**，吸去或甩掉酶标板内的液体，拍干。重复此洗板步骤 **3 次**。

4. **加 HRP 酶结合物：**加 HRP 酶结合物工作液 **100μL**/孔，酶标板加上封板覆膜，**37°C**孵育 **30 分钟**。

5. **洗板：**甩尽孔内液体，洗板 **3 次**，方法同步骤 3。

8. **加底物：**加底物溶液 **100μL**/孔，酶标板加上封板覆膜，**37°C**避光孵育 **15 分钟**左右。

9. **加终止液：**加终止液 **50μL**/孔，终止反应。

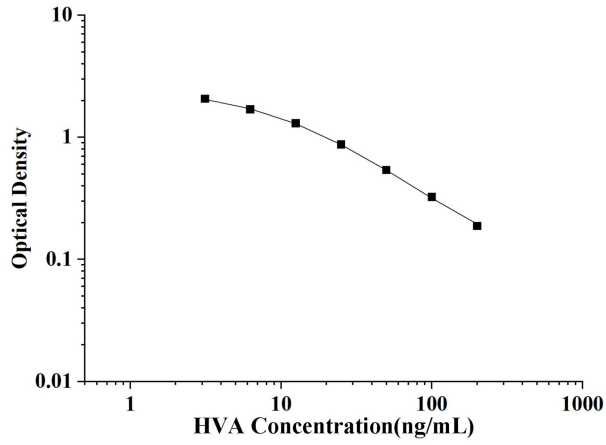
10. **读数：**立即用酶标仪在 **5 分钟**内测定每个孔 **450nm** 的光密度(OD 值)。

结果判断

1. 本说明书中的参考标曲仅供参考，实验者应以每次实验的标准品数据绘制标准曲线并计算样本中目标物质的含量。

2. 绘制标准曲线时应先计算标准品和样本复孔的平均 OD 值。然后以浓度为横坐标，校正后的 OD 值为纵坐标，使用软件进行非线性四参数拟合，以得到标准曲线并根据标准曲线计算样本的浓度。

3. 样本的终浓度为计算得到的样本浓度值与相应稀释倍数的乘积。

数据处理教程二维码	参考标曲
	

试剂盒基本性能

特异性：本试剂盒用于检测 HVA，经检测与其它相似物质无明显交叉反应。然而，受技术及样本来源的限制，不可能完成所有相关或相似物质交叉反应检测，因此本试剂盒有可能与未经检测的其它物质有交叉反应。

灵敏度：最小可测 HVA 达 0.97 ng/mL。灵敏度是通过计算 20 个空白孔的平均 OD 值加 3 倍标准差，并换算为相应浓度得出的。

精密度实验：本试剂盒的精密度≤10%，符合精密度质量控制标准。精密度可分为板内精密度和板间精密度。分别通过同一批次和不同批次试剂盒测定样本值的变异系数（CV）来评估，CV（%）= Standard Deviation（SD）/Mean×100。

回收率实验：本试剂盒回收率为 80-120%，符合回收率质量控制标准。回收率分为加标回收率和样本稀释线性回收率。加标回收率：向不同样本中添加已知浓度的 HVA，进行回收实验，得出回收率范围和平均值。样本稀释线性回收实验：将含 HVA 的样本按不同倍数（如 2 倍、4 倍等）稀释，得出回收率范围及平均值。

稳定性实验：经测定，按说明书推荐的方式保存，试剂盒在有效期内效果最佳。

声明

1. 限于现有条件及科学技术水平，尚不能对所有原料进行全面的鉴定分析，本产品可能存在一定的质量技术风险。

2. 本试剂盒在研发过程中去除/降低了生物学样本中的一些内源性干扰因素，并非所有可能影响的因素均已去除。

3. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及当时的实验环境等因素密切相关，本公司仅对试剂盒本身负责。

4. 为了达到好的实验结果，请只使用本公司试剂盒内提供的试剂，不要混用其他制造商的产品，严格按照说明书操作。

5. 由于操作过程中试剂制备以及酶标仪参数设置不正确，可能导致结果异常，实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器。

6. 即使是相同人员操作也可能在两次独立实验中得到不同的结果，为保证结果的重现性，需要控制实验过程中每一步的操作。

7. 试剂盒发货前会经过严格的质检，然而，因为运输条件、实验设备差异等等因素影响，用户检测结果可能跟出厂数据不一致。不同批次间试剂盒间的差异也可能来自上述原因。

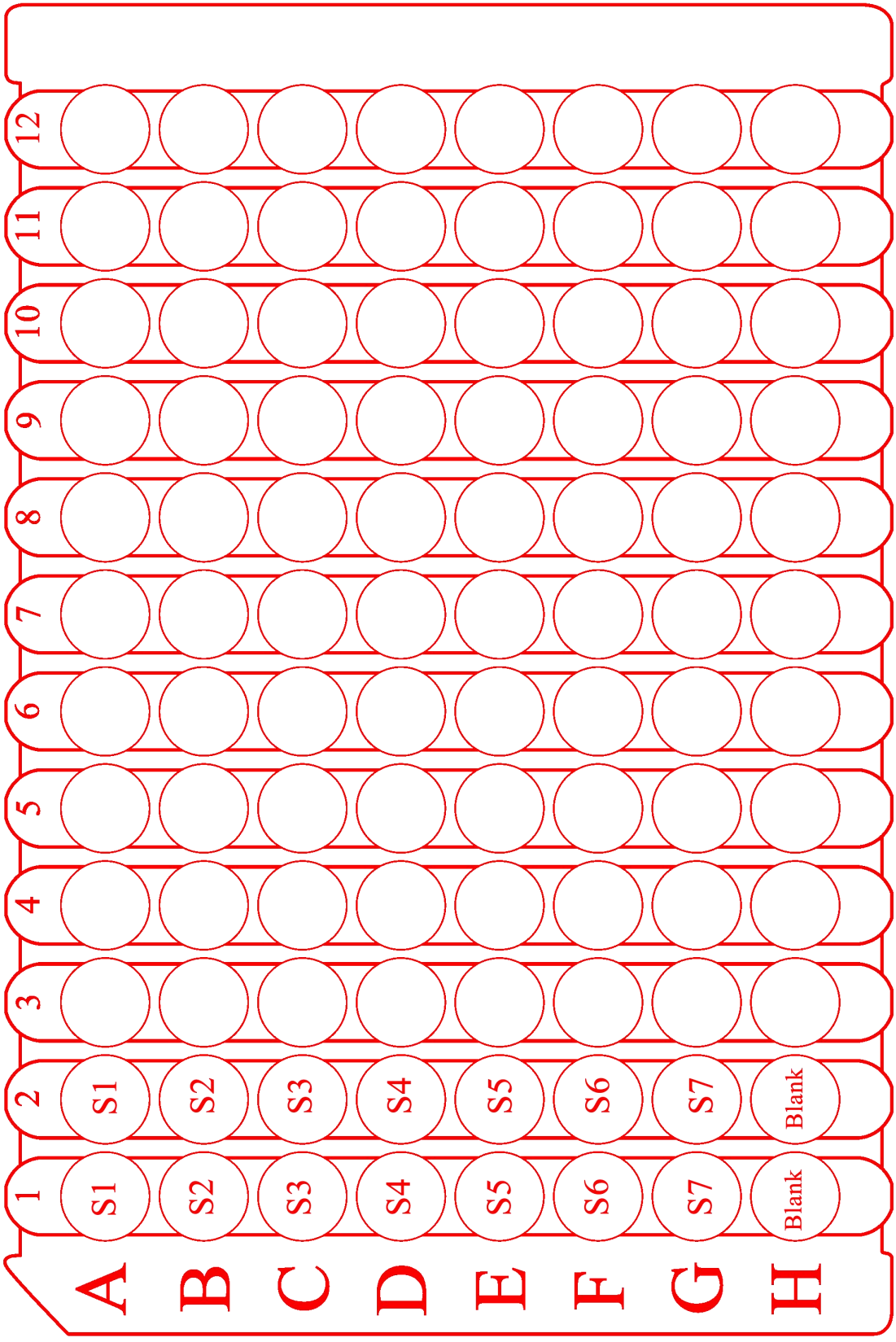
8. 本试剂盒未与其他厂家同类试剂盒或不同方法检测同一目的物的产品进行对比，所以不排除检测结果不一致的情况。

9. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，本公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。

技术资源

微信扫描下方二维码，可获得更详细的 ELISA 实验指南和常规问题分析。有任何技术问题，请与我司技术支持联系(建议及时对显色结果拍照，保留实验数据、所用板条以及未使用的试剂)。

微信公众号

技术支持微信

排版布局