(仅供科研使用，不得用于临床诊断!)

D-乳酸(D-LA)定量检测试剂盒（ELISA）使用说明书

货号：JYM0120Un

试剂盒性能

物理性能：各液体组分澄清透明、无沉淀或者絮状物。微孔板铝箔袋应真空包装，无破损漏气。
标准曲线线性：校准品剂量反应曲线相关系数 $R^2 \geq 0.9900$。

精密度：批内变异系数 CV%小于 10%；批间变异系数 CV%小于 15%。

灵敏度：最低检出剂量小于 0.375 μmol/L。

回收率：回收率在 85%-115%之间。

敏感性：本试剂盒识别天然和重组D-乳酸(D-LA)，与结构类似物无交叉。

稳定性：2-8℃保存，有效期 6 个月。

检测范围：3 μmol/L-48 μmol/L。

用途：用于检测血清、血浆、组织、细胞培养上清液等样本中D-乳酸(D-LA)的浓度。

实验原理

本试剂盒采用竞争ELISA法。首先，往预先包被D-乳酸(D-LA)抗体的微孔板中依次加入样本/校准品和Assay Diluent，温育后洗涤。洗涤后再加入SA-HRP温育，再次洗涤后，加入底物TMB显色，待标准品颜色显示一定梯度后用终止液终止反应，读取OD值。OD值高低和样品中的D-乳酸(D-LA)呈负相关。本试剂盒具有灵敏度高、特异性强、重复性好、操作简单、快速等特点，对样本中D-乳酸(D-LA)的减少或升高有可靠的检出性能。

试剂盒组分与保存

未开封的试剂盒保存在 2-8℃，不得使用过期试剂盒。

组分	数量	主要成分
校准品	0.2ml/管*6 管	抗原配制的 6 个浓度标准品
预包被微孔板	96T/48T	预包被固相抗体
SA-HRP	12mL	HRP 标记物
Assay Diluent	12mL	用于分离D-乳酸(D-LA)与结合蛋白
样本稀释液	6mL	PBS (0.01 M, pH = 7.4)
TMB显色液	12mL	TMB
终止液	12mL	酸性溶液
20×浓缩洗涤液	30mL	含 0.15%Tween20 的 PBS
说明书	1 份	--
自封袋	1 个	--
不干胶	2 片	--

校准品浓度依次为：48, 24, 12, 6, 3, 0 μmol/L。

注意：

1：使用前请检查试剂盒中试剂的标签和数量与表格是否一致。

2：如果试剂盒的组份需要再次使用，请确保上一次使用之后没有被污染。

3：酶标板单次未使用完，要谨记密封放到 2-8℃保存。

试验所需自备试验器材

1. 标准规格酶标仪。
2. 自动洗板机。
3. 振荡器。
4. 系列可调节移液器及吸头，一次检测样品较多时，最好用多通道移液器。

试剂盒限制性

1、仅供科研使用，不得用于临床诊断。

2、在试剂盒标示的有效期内使用。

3、跟其他厂家的试剂盒或者组分不能混用。

4、请做预实验，如果样本OD值低于最高标准品OD值，请适当稀释后，再重新测定。。

5、通过其他方法得到的检测结果，与本试剂盒测定结果不具有直接的可比性。

注意事项

1) 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。

2) 严格按照规定的时间和温度进行温育以保证准确结果。所有试剂都必须在使用前达到室温20-25℃。使用后立即冷藏保存试剂。

3) 洗板不正确可以导致不准确的结果。在加入底物前确保洗板后拍干孔内残留液体。温育过程中请使用封板膜。

4) 消除板底残留的液体和手指印，否则影响 OD 值。

5) 底物显色液应呈无色或很浅的颜色。

6) 避免试剂和标本的交叉污染以免造成错误结果。

7) 在储存和温育时避免强光直接照射。

8) 任何反应试剂不能接触漂白溶剂或漂白溶剂所散发的强烈气体。任何漂白成分都会破坏试剂盒中反应试剂的生物活性。

9) 检测使用的酶标仪需要安装能检测 450nm 波长的滤光片，建议预热15分钟。

10) 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。

11) 试验中所用的 EP 管和吸头均为一次性使用，严禁混用。

样品的准备和保存

以下只是列出样品采集和保存的一般指南。所有样本采集保存过程中，不得使用叠氮钠做为防腐剂。样品如果不立即分析，应分装后冷冻保存，且避免反复冻融。

1、 **血清：**将收集于血清分离管的全血标本在室温静置 30min 以上，不超过 2 小时，然后 2-8℃，2500-3500×g 离心 20min，仔细收集上清；

2、 **血浆：**应根据标本的要求选择 EDTA 或柠檬酸钠作为抗凝剂，样品采集后 30min 内在 2-8℃，3000×g 离心 15min，仔细收集上清。保存过程中如有沉淀形成，应再次离心；

3、 **尿液：**用无菌管收集，2-8℃，2500-3500×g 离心 10min，仔细收集上清。保存过程中如有沉淀形成，应再次离心。胸腹水、脑脊液参照实行；

4、 **细胞培养上清：**收集液体后于 2-8℃，2500-3500×g 离心 20min，除去杂质及细胞碎片，取上清检测。

5、 **细胞裂解液：**贴壁细胞用预冷的 PBS(0.01M,pH=7.4)轻轻清洗，然后用胰蛋白酶消化，2-8℃，1000×g 离心 5min 后收集细胞；悬浮细胞可直接离心收集。收集的细胞用冷的 PBS 洗涤 3 次。每 1×10^6 个细胞中加入 150-200μL PBS 重悬，并通过反复冻融或超声使细胞破碎(推荐在 PBS 中加入蛋白酶抑制剂；若含量很低可减少 PBS 的体积)。将提取液于 2-8℃，10000×g 离心 10min，取上清检测；

6、 **组织样本：**用预冷的 PBS(0.01M,pH=7.4)冲洗组织，去除残留血液，称重后将组织剪碎。将剪碎的组织与对应体积的 PBS(一般按 1:9 的重量体积比，比如 1 g 的组织样品对应 9 mL 的 PBS，具体体积可根据实验需要适当调整，并做好记录。推荐在 PBS 中加入蛋白酶抑制剂)加入匀浆器中，在冰上充分研磨。为了进一步裂解组织细胞，可以对匀浆液进行反复冻融或超声破碎。最后将匀浆液于 2- 8℃，10000×g 离心 5-10min，取上清检测；

7、 **其它生物标本：**2- 8℃，2500-3500×g 离心 20min，仔细收集上清。

样品外观：样品应清澈透明，悬浮物应离心去除。

样品保存：样品收集后尽快检测。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℃(6 个月内检测），避免反复冻融。

注意：裂解液常用PBS缓冲液，或使用中等强度RIPA裂解液。使用RIPA裂解液时，PH值需调整为PH7.2-7.4。避免使用含NP-40，Triton X-100和DTT的组分，会严重抑制试剂盒工作。推荐使用50mM Tris+0.9% NaCL+0.1% SDS，pH 7.3。

试剂准备

1、使用前，所有的组分室温放置 120 min，确保充分复温到室温。

2、浓缩洗涤液：从冰箱取出的浓缩洗涤液，会有结晶产生，这属于正常现象，水浴加热使结晶完全溶解。浓缩洗涤液与蒸馏水，按 1:20 稀释，即 1 份的浓缩洗涤液，添加 19 份的蒸馏水。

操作程序

1. 将各种试剂移至室温平衡120min，取浓缩洗涤液，根据当批检测数量，用蒸馏水 1：20 稀释，混匀后备用；

2. 将预包被板从密封袋中取出，设一个空白对照孔，不加任何液体；每个校准品设 2 孔，每孔加入对应校准品 15μL；其余每个检测孔直接加待测样品或质控品 15μL；

3. 除空白孔外所有孔加入 Assay Diluent 100μL，混匀，贴上封板膜，置室温（20-25℃）温育 60min；

4. 洗板：弃去孔内液体，每孔加入洗涤液300μL，静置10sec后，弃去孔内液体。重复 3 次后在吸水纸上拍干；

5. 每孔加入 SA-HRP 100μL（空白对照孔除外），混匀，贴上封板膜，置室温（20-25℃）温育 30min；

6. 洗板：弃去孔内液体，每孔加入洗涤液300μL，静置10sec后，弃去孔内液体。重复 3 次后在吸水纸上拍干；

7. 每孔加TMB显色液100μL，置 37℃避光显色 15min左右。观察标准孔中显色液颜色变化，若蓝色呈现明显深浅梯度即可每孔加终止液 100μL进行终止。该过程中避免过度显色造成标准孔蓝色都过深而不成梯度变化；

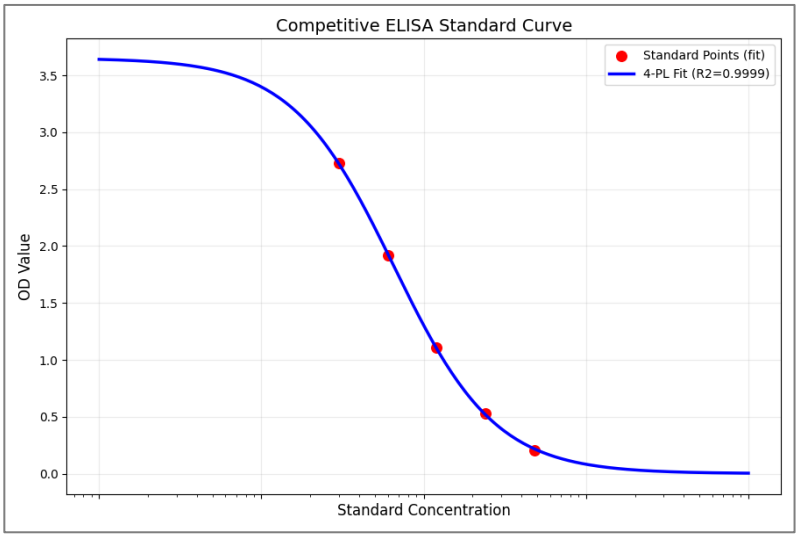
8. 终止后，立即用酶标仪读数，取波长450nm，测定各孔光密度值（OD值）。

结果计算

推荐使用Origin，ELISA Calc，Python等专业软件进行标曲绘制和结果计算，无强制规定，选自己最擅长的工具，确保拟合的标准曲线R平方值大于等于0.9200，接近1最好。以下提供一个例图供参考：

1、以标准品浓度对数值(以10为底)做为横坐标，对应的吸光度（OD 值）作为纵坐标，利用计算机软件，采用四参数 Logistic 曲线拟合（4-PL），创建标准曲线方程，通过样本的吸光度（OD 值），利用拟合得到的方程计算样品的浓度值。

2、如果样品被稀释，通过上述方法测的的浓度值，要乘以稀释倍数，才是样品的最终浓度。



（例图，仅供参考）

[问题分析]

若实验效果不好，请及时对显色结果拍照，保存实验数据，保留所用板条及未使用试剂，然后联系我公司技术支持为您解决问题。同时您也可以参考以下资料：

[问题解答]

问题描述	可能原因	相应对策
标准曲线梯度差	吸液或加液不准	检查移液器及吸头
	平衡时间太短	保证充足的平衡时间
	洗涤不完全	保证洗涤时间和洗涤次数及每孔的加液量
显色很弱或无色	孵育时间太短	保证充足的孵育时间
	实验温度不正确	使用推荐的实验温度
	试剂体积不够或漏加	检查吸液及加液过程，保证所有试剂按顺序足量添加
	稀释不正确	
	酶标记物失活或底物失效	混合酶结合物和底物，通过迅速显色来检查判断
读数数值低	酶标仪设置不正确	在酶标仪上检查波长及滤光片设置
		提前打开酶标仪预热
变异系数大	加液不正确	检查加液情况
背景值高	检测抗体的工作浓度过高	使用推荐的稀释倍数
	酶标板洗涤不完全	保证每步清洗完全；如果用自动洗板机，请检查所有的出口是否有堵塞；是否使用试剂盒配备的洗涤液
	洗液有污染	配制新鲜的洗液
灵敏度低	ELISA 试剂盒保存不当	按说明书要求保存相关试剂
	读数前未终止	OD 读数前应在每孔中加入终止液

[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，本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，请使用者使用前充分考虑到样本可能的使用量，预留充足的样本。

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。

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，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。