

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

## 预览版

(此说明书仅供参考，实际以随货发说明书为准)

# 小鼠膜联蛋白 A5(ANXA5)ELISA 试剂盒 说明书

Mouse ANXA5 (Annexin V) ELISA Kit

货号：EM23280

若您在使用过程中遇到任何疑问或需要进一步的帮助，欢迎您通过以下方式联系我们：

✉ 邮箱（销售）      order@enkilife.cn  
✉ 邮箱（技术支持）   tech@enkilife.cn  
公司电话            027-87002838  
网址                 www.enkilife.cn



订阅微信公众号  
获取更多技术信息  
及前沿动态

保质期：请见试剂盒外包装标签。

技术支持：为了更好地给您提供服务，联系时请告知产品外包装标签上批号。

用途

该试剂盒用于体外定量检测血清、血浆或其他相关生物液体中Mouse ANXA5浓度。

灵敏度、检测范围、特异性和重复性

- 灵敏度：0.055ng/mL。
- 检测范围：0.15-10ng/mL。
- 特异性：可检测样本中的 Mouse ANXA5,且与其它类似物无明显交叉反应。
- 重复性：板内，板间变异系数均<10%。

检测原理

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法。用抗 Mouse ANXA5 抗体包被于酶标板上，实验时样品（或标准品）中的 Mouse ANXA5 会与包被抗体结合。后依次加入生物素化的抗 Mouse ANXA5 抗体和 HRP 酶标记的亲合素，抗 Mouse ANXA5 抗体与结合在包被抗体上的 Mouse ANXA5 结合，生物素与亲合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 HRP 酶的催化下呈现蓝色，加终止液后变成黄色。用酶标仪在 450 nm 波长处测 OD 值，Mouse ANXA5 浓度与 OD450 OD 值之间呈正比，通过绘制标准曲线计算出样品中 Mouse ANXA5 的浓度。

 试剂盒组成及保存

未开封试剂盒应保存在 2-8℃。收到货后请参照下表中保存条件进行存储。

| 组分名称                                                           | 规格            | 保存条件及注意事项           |                             |
|----------------------------------------------------------------|---------------|---------------------|-----------------------------|
| 酶标板<br>Micro Plate                                             | 96T: 8 孔×12 条 | 未拆封:<br>-20℃, 12 个月 | 未用完:<br>应放回铝箔袋中密封好, -20℃保存  |
|                                                                | 48T: 8 孔×6 条  |                     |                             |
| 标准品<br>Reference Standard                                      | 96T: 2 支      | 未溶解:<br>-20℃, 12 个月 | 每次实验请使用新溶解的标准品, 溶解后未用完标准品弃用 |
|                                                                | 48T: 1 支      |                     |                             |
| 浓缩生物素化抗体(100×)<br>Biotinylated Detection Ab Concentrate (100×) | 96T:120μL×1 支 | -20℃, 12 个月         | 未用完: 浓缩液请密封好后放回-20℃, 工作液请丢弃 |
|                                                                | 48T: 60μL×1 支 |                     |                             |
| 浓缩 HRP 酶结合物(100×)<br>HRP Conjugate Concentrate (100×)          | 96T:120μL×1 支 | -20℃ (避光), 12 个月    | 未用完: 浓缩液请密封好后放回-20℃, 工作液请丢弃 |
|                                                                | 48T: 60μL×1 支 |                     |                             |
| 标准品&样品稀释液<br>Reference Standard & Sample Diluent               | 20mL×1 瓶      | 2-8℃, 12 个月         |                             |
| 生物素化抗体稀释液<br>Biotinylated Detection Ab Diluent                 | 14mL×1 瓶      |                     |                             |
| HRP 酶稀释液<br>HRP Conjugate Diluent                              | 14mL×1 瓶      |                     |                             |
| 浓缩洗涤液(25×)                                                     | 30mL×1 瓶      |                     |                             |

|                                    |          |                 |
|------------------------------------|----------|-----------------|
| Wash Buffer Concentrate (25×)      |          |                 |
| 底物溶液 TMB<br>Substrate Reagent(TMB) | 10mL×1 瓶 | 2-8℃(避光), 12 个月 |
| 终止液<br>Stop Solution               | 7mL×1 瓶  | 2-8℃/常温         |
| 封板覆膜                               | 5 张      |                 |
| 产品说明书                              | 1 份      |                 |
| 质检报告                               | 1 份      |                 |

#### 说明:

保存时请确保所有试剂瓶的瓶盖都旋紧, 以防止试剂蒸发和避免微生物污染。  
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。

### ①检测前注意事项

1. 试验中请穿戴好防护装备, 接触血液样本或其它生物样本时, 请参照国家生物实验室安全防护条例做好生物安全防护工作。
2. 不同批号的试剂盒组份不能混用(Stop Solution除外)。
3. 试验中所用的EP管和吸头均为一次性使用, 请勿混用。
4. 刚开封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影响。暂时不用的板条应放入备用铝箔袋, 按照组分表中保存条件进行存放。
5. 已稀释过的标准品及生物素化抗体工作液、酶结合物工作液请勿重复使用。
6. 未用完的浓缩生物素化抗体(100×)、浓缩HRP酶结合物(100×)及其它原液请按照组分表中的保存条件进行存放。
7. 酶标仪需要安装能检测450±10nm波长的滤光片, 检测范围在0-3.5之间。

### 📍检测前自备物品

1. 酶标仪 (450nm波长滤光片) 、37℃恒温孵育箱。
2. 1.5mL EP管、吸水纸。
3. 移液器及一次性吸头: 0.5-10μL, 2-20μL, 20-200μL, 200-1000μL。
4. 双蒸水或去离子水。

## 📄样本处理

### ①样品收集方法参考

不同样本处理时会有一定差异, 在选择样本制备前, 应充分了解样本自身特性, 并尽可能规避样本处理过程中所使用试剂对后续实验的影响。同时避免样本在不合理的温度及时间下停留。以下处理方法仅供参考, 更多样本处理及注意事项请见官网《ELISA样本制备指南》。

## 样本处理方法建议:

血清与血浆因凝血过程导致成份上有一定差异,在选择制备之前应充分了解并考虑待测蛋白在血清血浆中含量差异。可参考Enkiline官网《ELISA样本制备指南》。

1. **血清:** 使用血清分离管 (SST), 让样本在室温下凝血30分钟, 然后以1000 x g的离心力离心15分钟。取出血清, 立即进行检测或分装储存在 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 。避免反复冻融。避免使用高血脂样品。
2. **血浆:** 使用EDTA或肝素作为抗凝剂 (建议使用带抗凝剂的采血管), 样品采集后轻轻使其与抗凝剂充分混合, 30分钟内于1000 x g离心15分钟, 取上清即可检测。短期保存可置于2-8 $^{\circ}\text{C}$ 。制备过程应轻拿轻放, 使用无菌器具, 以避免溶血。同时应避免使用高血脂样品。

## 3. 组织匀浆:

3.1将目标组织置于冰上, 剪碎后, 用预冷的PBS (0.01M, pH=7.4)冲洗组织, 去除残留血液, 称重备用。

3.2将剪碎的组织与预冷的PBS按一定质量体积比(1g组织样品加入9mL的PBS, 具体比例可根据实验需要适当调整。推荐在PBS中加入蛋白酶抑制剂, 例如PMSF, 以抑制匀浆过程释放的蛋白酶活性, 避免目标蛋白被酶解)加入玻璃匀浆器中, 在冰上充分研磨。

3.3为了进一步裂解组织细胞, 可对匀浆液进行超声破碎 (注意使用冰浴降温, 并控制好超声功率及时间, 避免蛋白变性及过多自由基产生)。最后将匀浆液5000 x g离心5-10分钟, 取上清检测。

注意:

A.一些组织样本 (如肝脏、肾脏、胰腺) 含有较高浓度的内源性过氧化物酶, 其会与TMB底物反应导致假阳性。在这种情况下, 可尝试将组织剪碎后, 使用3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 完全浸泡组织10-15分钟, 用预冷PBS将残留 $\text{H}_2\text{O}_2$ 冲洗干净, 正常进行匀浆后检测。

B.也可尝试使用温和的裂解液促进组织裂解及胞内蛋白的释放。但应尽量避免使用含Triton X-100、NP-40或SDS等表面活性剂的裂解液, 在没有蛋白酶抑制剂情况下, 它们会促进溶酶体破裂进而导致蛋白酶被更多释放进组织匀浆液中, 降解目标蛋白, 影响检测准确度。同时其过高含量还会严重干扰试剂盒反应。在物理裂解效果不好情况下, 可尝试使用EnkiLife新一代裂解液, RC0005 Cell/Tissue Lysis Buffer进行裂解。

## 4. 细胞提取液:

### 细胞收集:

贴壁细胞收集: 用预冷的PBS沿培养皿壁轻轻清洗两次, 去除培养基。然后使用胰蛋白酶 (推荐使用EnkiLife RC0001 胰酶细胞消化液) 对贴壁细胞进行消化, 使其从培养皿表面脱落, 1000 x g离心5分钟, 收集细胞。

悬浮细胞收集: 1000 x g离心5分钟收集细胞。

半悬浮半贴壁细胞: 取上清按悬浮细胞收集方法收集悬浮液细胞。然后按贴壁细胞收集方法收集贴壁细胞, 将两者收集细胞使用PBS重悬, 混匀后, 1000 x g离心5分钟即可完成收集。

### 细胞破碎:

将收集的细胞用预冷的PBS洗涤3次。每 $10^6$ 个细胞中加入150-200 $\mu$ L PBS重悬并通过超声(参考设置:冰浴, 3-5mm探头, 150-300W, 每次工作1-2秒, 间隔30秒, 3-5次循环)使细胞破碎(若蛋白含量很低可减少PBS的体积)。将提取液于 $1500\times g$ 离心10分钟, 取上清检测。

5. **细胞培养上清或其他生物体液:** 收集液体后 $1000\times g$ 离心20分钟, 除去杂质及细胞碎片。取上清检测。

## ① 样品注意事项

1. 样品收集后保存说明:

1周内检测: 2-8 $^{\circ}$ C, 保存。

1个月内检测: 请分装成单次使用量, 并保存于-20 $^{\circ}$ C。

3个月内检测: 请分装成单次使用量, 并保存于-80 $^{\circ}$ C。

所有样本应避免反复冻融。

2. 请注意, 您样本的浓度范围可能超过试剂盒的检测范围。如遇此情况, 建议先进行预实验, 以确定合适的稀释比例, 确保结果的准确性。(建议查阅文献后先做预实验, 以确定稀释倍数)

3. 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。

4. 若使用化学裂解液制备组织匀浆或细胞提取液, 由此引入的某些化学物质可能会导致测值结果出现偏差。

5. 请知悉, 部分重组蛋白可能与试剂盒中的捕获或检测抗体不匹配, 导致无法检测。

## 📍 检测前准备工作

1. **平衡至室温:** 将试剂盒提前20分钟取出冰箱, 使其平衡至室温。

2. **酶标仪预热:** 检测时, 请至少提前15分钟打开酶标仪, 使酶标仪光源稳定。

3. **洗涤液制备:** 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 $^{\circ}$ C水浴微加热使结晶完全溶解后再配制洗涤液。当日使用。

4. **标准品工作液制备:**

4.1 将**标准品**于 $10000\times g$ 离心1分钟。

4.2 用标准品&样品稀释液将标准品稀释, 得到指定浓度标准品工作液。

**注意:** 最后一管作为空白对照。加入**标准品&样品稀释液**即可。

5. **生物素化抗体工作液制备:**

计算用量: 以100 $\mu$ L/孔的试剂需求量进行计算, 并额外增加100-200 $\mu$ L, 以备不时之需。

抗体稀释:

在实验前15分钟, 使用生物素化抗体稀释液将**浓缩生物素化抗体(100 $\times$ )**稀释并混匀至1 $\times$ 工作浓度。稀释后的抗体应于当日使用, 以保证实验效果。

## 6. 酶结合物工作液:

计算用量: 以100 $\mu$ L/孔的试剂需求量进行计算, 并额外增加100-200 $\mu$ L, 以备不时之需。

抗体稀释: 在实验前15分钟, 使用HRP酶稀释液将**浓缩HRP酶结合物(100 $\times$ )**稀释并混匀至1 $\times$ 工作浓度。稀释后的抗体应于当日使用, 以保证实验效果。

## 📍 实验操作过程

### 1. 加标准品&样品:

将不同浓度**标准品工作液**按从上到下顺序加入到前两列酶标板孔中, 每个浓度两孔, 每孔100 $\mu$ L; 待测样品加入其余孔, 每孔100 $\mu$ L。高浓度样品需先稀释。

操作时, 从酶标板底部加样, 避免接触孔壁, 轻轻晃动混匀, 避免产生气泡, 加样操作控制在10分钟内完成。

### 2. 覆板&孵育:

撕开封板覆膜, 将板孔覆盖紧密。37 $^{\circ}$ C孵育90min。

### 3. 加生物素化抗体:

撕开覆膜, 清除并甩干板孔内液体, 无需洗涤。

按100 $\mu$ L/孔向所有孔加入稀释好的**生物素化抗体工作液**。轻轻晃动混匀, 覆盖**酶标板覆膜**。37 $^{\circ}$ C孵育60min。

### 4. 洗板1:

#### 手动洗板方法:

清除并甩干板孔内液体, 按350 $\mu$ L/孔, 加入稀释好的**洗涤液**, 浸泡1-2min, 清除并甩干板孔内液体, 在厚吸水纸上拍干板孔, 完成一次洗涤。

总计洗板3次。甩干板孔液体供下一步使用。

**洗板机参数建议:** 350 $\mu$ L/孔, 振板3-5S, 两点吸液。

### 5. 加酶结合物工作液:

按100 $\mu$ L/孔向所有孔加入稀释好的**酶结合物工作液**。轻轻晃动混匀, 覆盖**酶标板覆膜**。37 $^{\circ}$ C孵育30min。

### 6. 洗板2:

洗板5次, 步骤同第4步**洗板1**操作。

### 7. 加底物溶液(TMB):

按90 $\mu$ L/孔向所有孔加入**底物溶液(TMB)**。覆盖**酶标板覆膜**。37 $^{\circ}$ C, 避光孵育15min左右。

**提示:** 根据显色情况调整孵育时间, 但不要超过30分钟。一旦标准孔显示出清晰的梯度, 即可停止孵育。

### 8. 终止反应:

按50 $\mu$ L/孔, 向所有孔加入**终止液**, 终止反应。

提示：终止液的加入顺序应尽量与底物溶液的加入顺序相同。

9. 测量OD值：

立即用酶标仪在450nm波长测量酶标板各孔的OD值(光密度)。

📍 检测结果计算

1. 计算平均OD值并绘制标准曲线：

计算每组标准品复孔的平均OD值。

从每个标准品的平均OD值中减去空白孔的OD值，得到标准品矫正OD值。

以浓度为横坐标，OD值为纵坐标，使用Logistic函数绘制标准曲线。绘制时排除空白组的OD值。

2. 样本浓度计算：

将样本测得的OD值带入曲线中即可求出样本OD值对应浓度。样本若有稀释倍数，在所得浓度上乘以稀释倍数即可得到样本原液浓度。

3. 高OD值样品处理：

如果样品的OD值超过了标准曲线的上限，应适当稀释样品后重新测量。

📄 技术数据

典型数据

以下数据仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线。



精密度

板内精密度：在一块板子上分别对低、中、高浓度的样本各进行20次检测。

板间精密度：在三块不同的实验板上，对低、中、高浓度样本各进行20次检测。

|    | 批内变异系数 |   |   | 批间变异系数 |   |   |
|----|--------|---|---|--------|---|---|
| 样本 | 1      | 2 | 3 | 1      | 2 | 3 |

|            |      |      |      |      |      |      |
|------------|------|------|------|------|------|------|
| 数量         | 20   | 20   | 20   | 20   | 20   | 20   |
| 平均值(ng/mL) | 0.53 | 0.99 | 4.21 | 0.51 | 0.97 | 4.06 |
| 标准差        | 0.03 | 0.04 | 0.23 | 0.04 | 0.05 | 0.13 |
| 变异系数 (%)   | 5.15 | 4.04 | 5.43 | 0.04 | 5.41 | 3.22 |

### 回收率

向5个不同样本中分别添加已知浓度的目标蛋白，进行回收实验，以确定回收率的范围和计算平均回收率

| 样本类型        | 回收率范围 (%) | 平均回收率 (%) |
|-------------|-----------|-----------|
| 血清 (n=5)    | 86-98     | 92        |
| 血浆 (n=5)    | 87-99     | 93        |
| 细胞培养基 (n=5) | 89-103    | 97        |

### 线性

首先，向5个样本中分别添加已知浓度的目标蛋白，并进行回收实验，以测定回收率的范围和平均回收率。随后，将这5个样本分别稀释至2倍、4倍、8倍和16倍的浓度，再次进行回收实验，以评估不同稀释倍数下的回收率范围和平均回收率。

|      |          | 血清<br>(n=5) | 血浆<br>(EDTA)(n=5) | 细胞上清<br>(n=5) |
|------|----------|-------------|-------------------|---------------|
| 1:2  | 回收率范围(%) | 87-101      | 93-106            | 94-104        |
|      | 平均回收率(%) | 92          | 99                | 99            |
| 1:4  | 回收率范围(%) | 83-95       | 94-107            | 90-106        |
|      | 平均回收率(%) | 90          | 101               | 96            |
| 1:8  | 回收率范围(%) | 86-98       | 94-110            | 93-104        |
|      | 平均回收率(%) | 93          | 101               | 96            |
| 1:16 | 回收率范围(%) | 81-95       | 91-105            | 90-102        |
|      | 平均回收率(%) | 88          | 99                | 95            |

### ①问题分析

如果实验结果不理想，请立即拍摄显色结果的照片，保存所有实验数据，并保留使用过的板条以及未用尽的试剂。之后，请联系我们的技术支持团队，以便我们协助您解决问题。同时，您也可以查阅以下资料以获取更多帮助。

| 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  | 检查并校准移液枪及吸头           |
|         | 标准品稀释不正确 | 溶解标准品时轻轻旋转瓶身，确保粉末完全溶解 |

|         |               |                                               |
|---------|---------------|-----------------------------------------------|
|         | 洗涤不完全         | 确保洗涤时间和次数，以及每孔的加液量                            |
| 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，确保按顺序足量添加                           |
|         | 稀释不正确         | 重新检查稀释步骤                                      |
|         | 酶标记物失活或底物失效   | 混合酶结合物和底物，通过显色结果判断                            |
| 读数数值低   | 酶标仪设置不正确      | 检查酶标仪的波长及滤光片设置，确保是450nm                       |
|         |               | 提前打开酶标仪预热15min及以上                             |
| 变异系数大   | 加液不正确         | 检查加液情况，确保准确性                                  |
| 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         | 使用新鲜的洗液                                       |
| 灵敏度低    | ELISA 试剂盒保存不当 | 按说明书要求保存试剂                                    |
|         | 读数前未终止        | OD 读数前向所有孔加入终止液                               |

## 产品使用声明：

- 质量技术风险提示：** 受限于当前科学技术水平和条件限制，尚无法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。
- 实验结果影响因素：** 实验结果受试剂有效性、操作者技能和实验环境等多种因素影响。为确保结果准确性，请准备充足的待测样品。
- 试剂使用指南：** 为获得最佳实验效果，建议仅使用本试剂盒内提供的试剂，并严格按照说明书操作。避免与其他制造商的产品混用。
- 操作注意事项：** 不正确的试剂配制或酶标仪参数设置可能导致实验结果异常。请在实验前仔细阅读说明书，并正确调整仪器参数。
- 结果重现性：** 即使是同一操作者，在两次独立实验中也可能得到不同结果。为确保结果的重现性，请严格控制实验过程中的每一步操作。
- 质量保证与差异说明：** 尽管试剂盒在发货前经过严格质检，但由于运输条件、实验设备差异等因素，用户检测结果可能与出厂数据存在差异。不同批次试剂盒间的差异也可能源于上述原因。
- 该试剂盒仅用于科研，不得用于临床诊断！**

□i 我们始终致力于提供高质量的产品，并感谢您的理解与支持。如有任何问题，欢迎随时联系我们的技术支持团队。