



Cytokine™ Human Epo ELISA Kit

货号: CZH311-96

线性范围: 0—200mIU/mL

检测样本类型: 血清、血浆、细胞上清和组织匀浆上清

总反应时间: 3hr 20min

本试剂盒内全部组分应保存在 2-8°C

本试剂盒仅用于科学研究使用, 严禁临床应用和疾病诊断

【产品规格及货号】

货号	名称	规格
CZH311-96	Human Epo ELISA KIT	96T/盒

【项目简介】

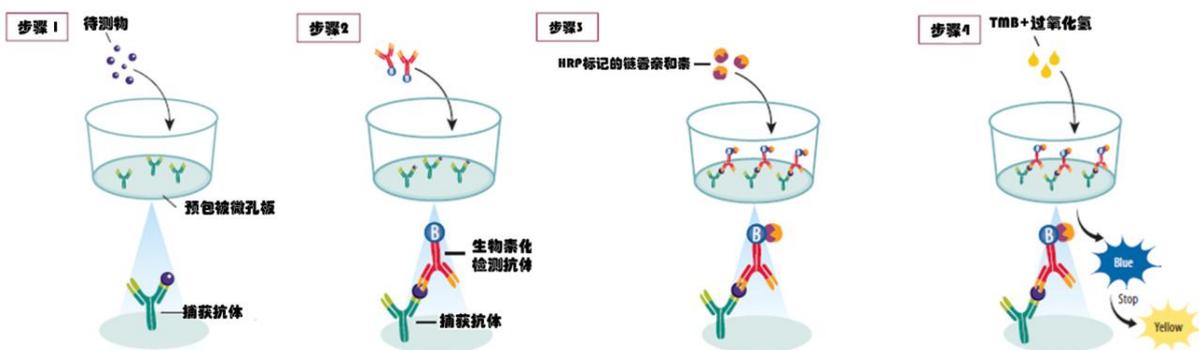
促红细胞生成素（Erythropoietin 简称 Epo）是一种主要由肾脏产生的分子量约为 30.4kDa 糖蛋白，是调节哺乳动物红细胞生成的主要因素。肾产生的 Epo 水平受氧气供应变化的调节。在缺氧条件下，循环体系中的 Epo 水平升高，从而导致红细胞增加。Epo 的过度表达可能与某些病理条件有关。当红细胞（RBC）过量产生时存在红细胞增多症。原发性红细胞增多症，如真性红细胞增多症是由于异常干细胞分化出的祖红细胞所致，并非 Epo 的增加所致，甚至在其病人中检出比正常人还低的 Epo 水平。但是另一方面，各种类型的继发性红细胞增多症均与产生高于正常水平的 Epo 有关。

Epo 生成量不足在某些形式的贫血症中被发现。包括肾功能衰竭和终末期肾病，慢性贫血疾病如慢性感染、自身免疫性疾病、类风湿性关节炎、艾滋病、恶性肿瘤、早产儿贫血、甲状腺功能减退症贫血和贫血营养不良。这些病症中许多都证明与 IL-1 和 TNF- α 的产生有关，这两者均是 Epo 活性抑制剂。其他形式的贫血包括再生障碍性贫血，缺铁性贫血，地中海贫血，巨幼红细胞性贫血，纯红细胞再生障碍和骨髓增生异常综合征，则非 Epo 不足所致，且个体常表现出 Epo 水平的升高。

【检验原理】

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法。酶标微孔板上预包被有抗人 Erythropoietin 单抗，当加入标准品、待测样本和生物素化的抗人 Erythropoietin 抗体，经过孵育，标准品和样品中含有的 Erythropoietin 可同时与酶标板的包被抗体和生物素化的检测抗体相结合。洗板后，游离的其他成分被洗去，加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素，生物素和链霉亲和素特异性结合，形成“包被单抗+人 Erythropoietin+生物素化抗体+链霉亲和素-HRP”免疫复合物。当加入 TMB 显色底物后，复合物上连接的 HRP 催化底物反应，生成蓝色产物，终止反应后变为黄色。在 450nm 处测定 OD 值，人 Erythropoietin 浓度与 OD450 值之间呈正比，可通过绘制标准曲线求出标本中人 Erythropoietin 的浓度。

【检验原理示意图】



【主要组成成份】

组成成份	96T	保存条件
1.抗体包被板	12×8 孔	2-8℃
2.标准品	1ml×1 支 (200mIU/mL)	2-8℃
	1ml×1 支 (100mIU/mL)	
	1ml×1 支 (50mIU/mL)	
	1ml×1 支 (20mIU/mL)	
	1ml×1 支 (5mIU/mL)	
	1ml×1 支 (2.5mIU/mL)	
	1ml×1 支 (0mIU/mL)	
3.样品稀释液	50ml×1 瓶	2-8℃
4.生物素化抗体工作液	10.5ml×1 瓶	2-8℃
5.酶结合物工作液	10.5ml×2 瓶	2-8℃
6.20×浓缩洗液	50ml×1 瓶	2-8℃
7.显色底物 A (含过氧化氢)	12ml×1 瓶	2-8℃
8.显色底物 B (含 TMB)	12ml×1 瓶	2-8℃ (避光)
9.终止液	12ml×1 瓶	2-8℃
10.封板膜	3 张	
11.产品说明书	1 份	

【试验所需自备器材和试剂】

- 1、 酶标仪 (含 450nm 和 600nm 波长滤光片)
- 2、 进口品牌高精度移液器及一次性吸头: 0.5-10 μ l, 2-20 μ l, 20-200 μ l 和 200-1000 μ l
- 3、 恒温箱、双蒸或去离子水、坐标纸等。(以上仪器耗材均可代购, 如有需要请联系)

【样本收集】

- 1、 收集血液的试管应为一次性的无热原和内毒素试管。
- 2、 血浆抗凝剂推荐使用 EDTA。避免使用溶血、高脂标本。
- 3、 血浆收集: 1000g 4℃离心全血 10min, 移液器吸取顶部的黄色血浆层, 千万不要碰触影响到白色至浅黄色的薄层。标本收集后若不及时检测, 请按照一次使用量分装, 冻存于-20℃或-70℃冰箱内, 避免反复冻融, 3 个月内检测。
- 4、 血清收集: 使用不含抗凝剂的采血管收集全血, 25℃自然凝结30min。2000g 4℃离心全血15min, 移液器吸取顶部的黄色血清层, 千万不要碰触影响到白色至浅黄色的薄层。标本收集后若不及时检测, 请按照一次使用量分装, 冻存于-20℃或-70℃冰箱内, 避免反复冻融, 3 个月内检测。
- 5、 细胞上清收集: 300g 离心 10min 去除沉淀物。标本收集后若不及时检测, 请按照一次使用量分装, 冻存于-20℃或-70℃冰箱内, 避免反复冻融, 1 个月内检测。

- 6、组织匀浆上清收集：用冷 1×PBS 冲洗掉组织上的血渍，准确称取组织样本重量，按照重量（mg）和体积（ μl ）比为 1:10 的比例加入冷 1×PBS 后在冰上进行组织匀浆，充分匀浆后将组织匀浆冻存在 -20°C 以下过夜。次日取出后反复冻融 2 次使细胞膜破碎，5000g 4°C 离心 5min，离心完毕后用移液器立即吸取上清至干净的 EP 管内。由于组织中含有大量蛋白酶可能会导致蛋白降解，因此离心吸取组织上清后应立即冻存 -70°C 冰箱内，避免反复冻融，1 个月内检测。需同时测定上清的总蛋白含量用于最终的校准。（1×PBS 配方：137mM NaCl、2.7mM KCl、8.1mM Na_2HPO_4 、1.5mM KH_2PO_4 ，0.22 μm 过滤）
- 7、血清或血浆样本冻存复溶后析出少量聚合的蛋白可能会影响实验结果，因此建议用样品稀释液进行 1:2 的稀释。如按此稀释后的血样依然高于标准品最高值需提高稀释度，重新检测；细胞上清样本需根据实际含量情况，原倍或用样品稀释液适当倍数稀释后加样（建议做预试验，已确定稀释倍数）；由于在不同组织中的表达丰度不同，组织匀浆上清建议从原倍开始做不同稀释度的预实验，确定稀释度后再进行正规实验。

【注意事项】

- 1、试剂盒使用前请保存在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 。
- 2、不同批号的试剂盒组分不能混用（洗涤液、反应终止液除外）。
- 3、充分轻微混匀对反应结果尤其重要，最好使用微量振荡器（使用最低频率），若无微量振荡器，可在反应前手工轻轻敲击酶标板框混匀。
- 4、在试验中标准品复孔检测，待测样本推荐平行双孔检测。
- 5、试验中所用的试管和吸头均为一次性使用，严禁在不同的液体之间混用！否则将影响试验结果。
- 6、试验中请穿着试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标本时，请严格按照国家生物实验室安全防护条例执行。
- 7、如果分次使用，请根据需要的量配制各组分，以免配制过多造成浪费而影响后续试验。剩余未用微孔条和干燥剂收到自封袋内扣紧自封条，密封口袋，放入 $2-8^{\circ}\text{C}$ ，并在有效期内用完。
- 8、显色底物避免与氧化试剂和金属接触，显色底物 A 液与 B 液混合后应为无色透明溶液，如果颜色变蓝应禁止使用，混合后的 A、B 液若本次试验内未用完，应舍弃切勿继续使用！
- 9、本试剂盒所有反应均需要在室温下孵育，当夏天实验室温度过高时请调节制冷设备；冬天实验室温度过低，可将恒温箱调至 25°C 代替室温反应。

【检测前准备工作】

- 1、请提前 20 分钟从冰箱中取出试剂盒，以平衡至室温。
- 2、用双蒸水将 20×浓缩洗涤液稀释成 1×工作液。剩余 20×浓缩洗涤液放回 $2-8^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

【洗涤方法】

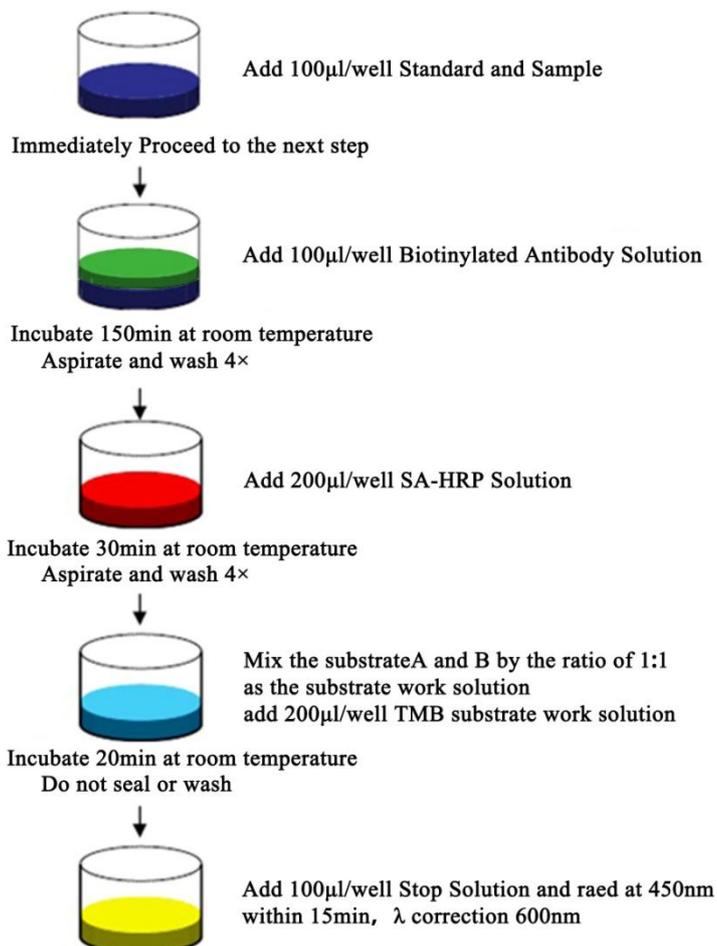
- 1、自动洗板机：要求注入洗涤液体积为 350 μl ，注入与吸出的浸泡时间间隔为 30 秒，洗板 4 次，最后一次完毕后，在洁净的吸水纸上拍干。
- 2、手工洗板：甩尽孔内液体，在洁净的吸水纸上拍干，每孔加入洗涤液体积为 350 μl ，静置 30 秒后甩尽液体，洗板 4 次，最后一次完毕后，在洁净的吸水纸上拍干。

【加样图设置】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S6	S6	Sa1	Sa1	Sa9	Sa9	Sa17	Sa17	Sa25	Sa25	Sa33	Sa33
B	S5	S5	Sa2	Sa2	Sa10	Sa10	Sa18	Sa18	Sa26	Sa26	Sa34	Sa34
C	S4	S4	Sa3	Sa3	Sa11	Sa11	Sa19	Sa19	Sa27	Sa27	Sa35	Sa35
D	S3	S3	Sa4	Sa4	Sa12	Sa12	Sa20	Sa20	Sa28	Sa28	Sa36	Sa36
E	S2	S2	Sa5	Sa5	Sa13	Sa13	Sa21	Sa21	Sa29	Sa29	Sa37	Sa37
F	S1	S1	Sa6	Sa6	Sa14	Sa14	Sa22	Sa22	Sa30	Sa30	Sa38	Sa38
G	S0	S0	Sa7	Sa7	Sa15	Sa15	Sa23	Sa23	Sa31	Sa31	Sa39	Sa39
H	B	B	Sa8	Sa8	Sa16	Sa16	Sa24	Sa24	Sa32	Sa32	Sa40	Sa40

注：S6—S0 为标准品 200—0mIU/mL；Blank 仅加入 A 液、B 液和终止液
 Sa1—Sa40 为样品 1 至 40#

【操作流程图】



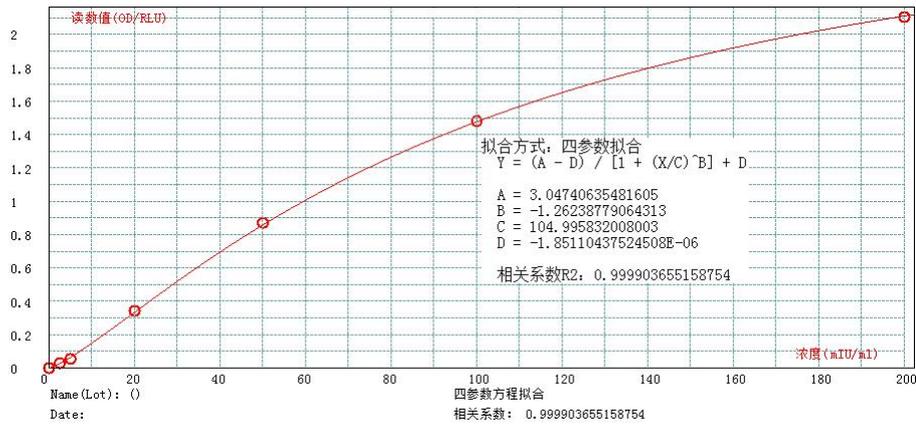
【操作详细步骤】

- 1、从已平衡至室温密封的铝箔袋中取出试验所需板条，未用的板条和干燥剂请收回铝箔袋内扣紧自封条，密封口袋，放入 2-8℃。
- 2、将标准品和待检样品对应微孔板按序编号，每次试验应设标准品 200mIU/ml(S6)、100mIU/ml(S5)、50mIU/ml(S4)、20mIU/ml(S3)、5mIU/ml(S2)、2.5mIU/ml(S1)、0mIU/ml(S0)、Blank 孔（仅加入 A 液、B 液和终止液）各 2 孔，推荐每一份待检样本也平行双孔检测。
- 3、在抗体包被板上按照上述加样图加样，标准品孔按 100 μ l/孔加入各个浓度标准品。测血清或血浆时：所有样品孔应先加入 50 μ l/孔的样品稀释液，然后每孔再加入血清或血浆样本 50 μ l，（样本共计稀释 2 倍）；检测细胞上清时：所有样品孔加入原倍或经稀释的细胞上清样本 100 μ l；检测组织匀浆上清时：所有样品孔加入原倍或经稀释的组织匀浆上清样本 100 μ l。随后除 Blank 外所有孔均按 100 μ l/孔加入生物素化抗体工作液，加入完毕后，用封板膜封住反应孔，室温 25℃ 孵育 150 分钟。（本步骤需连续加样，且应在 15min 内完成。）
- 4、小心揭掉封板膜，用洗板机或手工洗涤 4 遍，最后一次尽量扣干。
- 5、除 Blank 外所有孔均按 200 μ l/孔加入酶结合物工作液，加入完毕后，用封板膜封住反应孔，室温 25℃ 孵育 30 分钟。
- 6、提前 20 分钟打开酶标仪电源，预热仪器，设置好检测程序。
- 7、小心揭掉封板膜，用洗板机或手工洗涤 4 遍，最后一次尽量扣干。
- 8、根据试验实际用量将显色底物 A 和显色底物 B 等体积（1:1）混合（10min 内用完），按 100 μ l/孔加入所有孔内并用封板膜封住反应孔，室温 25℃ 避光孵育 20 \pm 10 分钟至 0mIU/ml(Blank)往上的 3 个浓度校准品孔呈现梯度淡蓝色后即可终止。
（备注：不同实验室温度、湿度和水质有所不同显色时间会略有差异，最适时间需要操作人员自行掌控）
- 9、加入终止液 100 μ l/孔，混匀后在 15 分钟内测量 OD₄₅₀ 和 OD₆₀₀ 值。在仪器保存读数结果并打印一份纸质数据。
- 10、试验完毕后将未用完的试剂按规定的保存条件放回冰箱保存，至有效期结束。建议保存酶标板框，以备下次或以后试验使用。

【结果判定】

- 1、计算样品和标准品 OD 值时均应减去标准品 0mIU/ml OD 值进行校正。以标准品浓度作横坐标，OD 值作纵坐标，手工或用本公司提供的软件进行 4-PL 标准曲线拟合。通过待测样本 OD 值可根据拟合方程反推出其浓度值。
- 2、若待测样本 OD 值高于标准曲线上限，应进行适当稀释后重测，计算浓度时应乘以稀释倍数。
- 3、若检测样本 OD 值-标准品 0mIU/ml (Blank) OD 值 \leq 0 时，则说明该样本中 Erythropoietin 含量低于试剂盒的最低检出限 0.9mIU/ml 需确定是否为样本保存不当或时间过长所致，则需购买更灵敏的试剂进行检测。
- 4、标准品 4-PL 拟合实例：

标准品浓度 (mIU/ml)	200	100	50	20	5	2.5	0
OD _{450nm-600nm}	2.124	1.501	0.890	0.362	0.074	0.049	0.019
Corrected OD _{450nm-600nm}	2.105	1.482	0.871	0.343	0.055	0.030	0



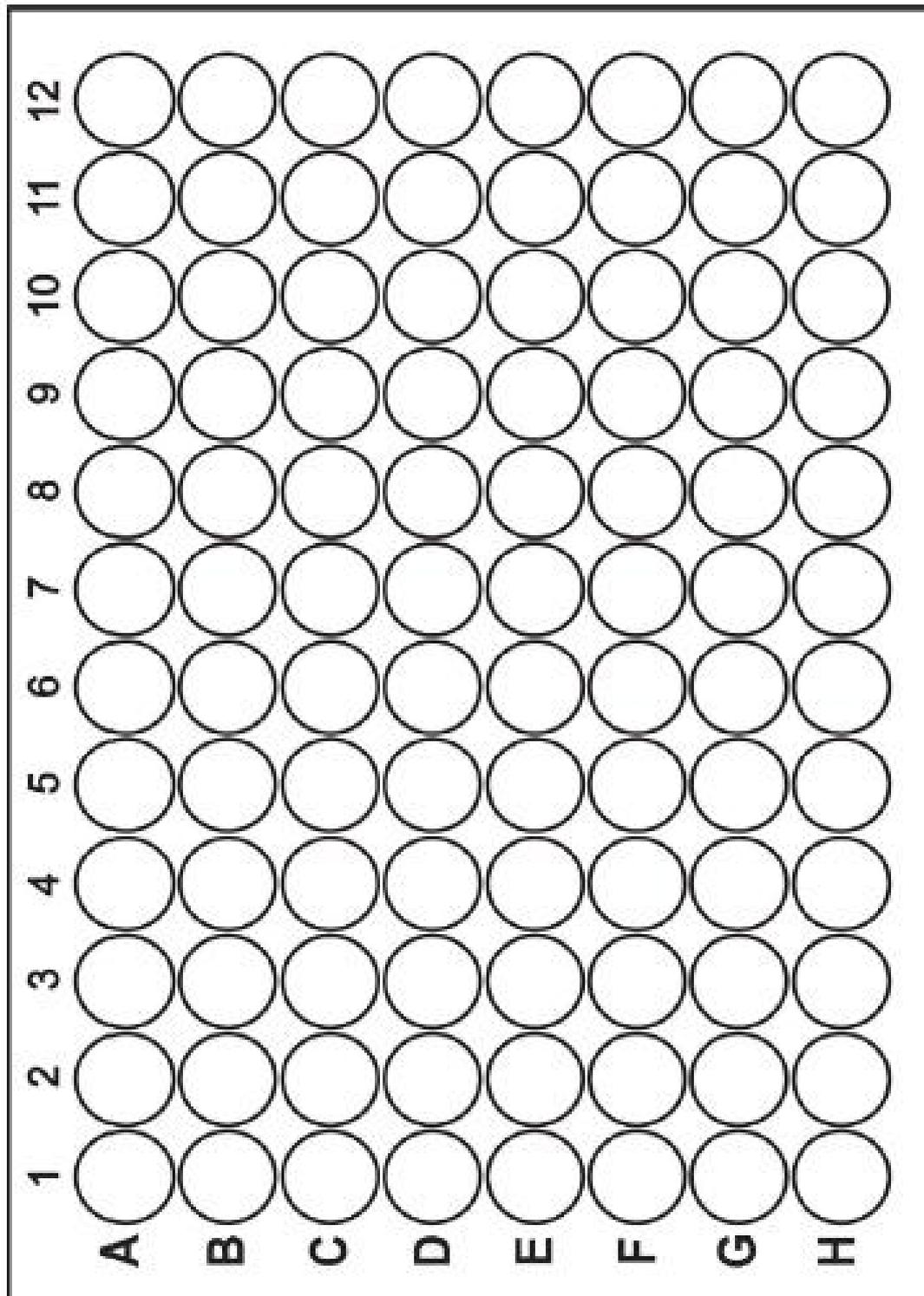
注: 以上数据和本图仅供参考, 应以同次试验标准品所绘标准曲线计算待测样本中人 Erythropoietin 的浓度。

【试剂盒性能】

- 1、最低检出限: 最低可检出的人 Erythropoietin 浓度为 0.9mIU/ml。
- 2、特异性: 不与 ANG、 β -ECGF、FGF-basic、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、MCP-1、M-CSF、IFN- γ 、RANTES 和 TNF- α 等反应。
- 3、重复性: 板内及板间变异系数均 \leq 10%。
- 4、溯源情况: 试剂盒标准品溯源至人 Erythropoietin WHO 国际标准物质, code (88/574)。

【实验设计布置图】

使用下面的这个酶标板实验设计布置图用于标准品和样品检测时的位置记录



【ELISA 常见问题分析】**问题一：高背景或 Blank OD 值偏高**

可能的原因	建议措施
Blank 孔被高值标准品或样品污染	洗涤时，勿将洗液洗出孔外避免交叉污染。
洗涤不充分	确保在洗涤时每个孔中都能充满洗液，同时确保能将残余液体从孔中彻底移除。
酶结合物浓度过高	请确保酶结合物按说明书规定稀释。
孵育温度过高	检查孵育温箱的温度是否正确稳定。
底物工作液在使用前曝光时间过长	混合后的底物工作液请在规定时间内使用。
最终读数前停留时间过长	加终止液后请在 5min 内读数。

问题二：系列标准品 OD 值偏低

可能的原因	建议措施
试剂未平衡至室温	开始试验前，请将试剂充分平衡至室温。
酶标板包装袋内有潮气	首次开袋标示日期，用自封袋封装好未使用的孔条并放入干燥剂。
样本中有抑制剂	叠氮化钠会抑制 HRP 活性。
试剂在使用前未混匀	所有配制的试剂均应在使用前充分混匀。
洗涤步骤过于剧烈	降低洗涤过程的压力。
洗板结束后，进行下一步操作间隔时间过长导致微孔板内干燥	实验过程切勿中断，应连续完成所有实验步骤。
加样体积偏小	确保实验中使用已经校准的移液器。

问题三：边缘效应

可能的原因	建议措施
液体蒸发	各个实验步骤间均应使用封板膜密封反应板。
酶标板包装袋内有潮气	首次开袋标示日期，用自封袋封装好未使用的孔条并放入干燥剂。

问题四：标准曲线不佳

可能的原因	建议措施
复溶冻干标准品时未混匀、平衡	应按本说明书要求，复溶、混匀并平衡 3min。
倍比稀释标准品时未混匀	稀释标准品的每一个步骤均应充分混匀。
过早稀释标准品	标准品应在临近使用前进行复溶、稀释。
加入的标准品体积不正确	应使用校准过的移液器，快速、等量的将标准品加入到各个微孔中

问题五：标准曲线良好，但样本无检测信号

可能的原因	建议措施
样本中无检测物或检测物含量极低	设置内参重新实验，或更换灵敏度更高的试剂
存在基质效应，样本中其他物质影响或掩盖检测	进行适当稀释，降低样本中内源性物质的干扰；或做系列稀释，检测回收率。
样本中检测物浓度极高，因此产生 Hook 效应，导致假阴性低值	将待测样本进行适当倍数稀释，使稀释后的浓度在试剂盒的检测范围内。

问题六：重复性差

可能的原因	建议措施
微孔中有气泡	用枪尖刺破微孔内的气泡。
试剂未混匀	确保试剂充分混匀。
样本中有杂质或沉淀物	使用前请离心。
微孔包被面被枪头划破	加液时小心操作。
使用用过的封板膜	每次必须使用新的封板膜，封住反应板。