

(仅供科研使用，不得用于临床诊断!)

## 人骨成型蛋白 2 (BMP-2) 定量检测试剂盒 (ELISA)

**规格:** 48T/96T

**检测范围:** 2.5 ng/mL - 80 ng/mL

**特异性:** 结构类似物无交叉

**灵敏度:** <0.1 ng/mL

**重复性:** 板内变异系数均<10%，板间变异系数均<15%。

**保存、有效期:** 2-8℃保存 6 个月

**用途:** 定量检测血清、血浆、细胞培养上清液等样本中人骨成型蛋白 2 (BMP-2) 的浓度。

使用试剂盒前，必须仔细阅读本说明书。如有任何问题，请通过以下方式联系我们：

免费电话：400-8332-227

官方热线：0595-2284-5743

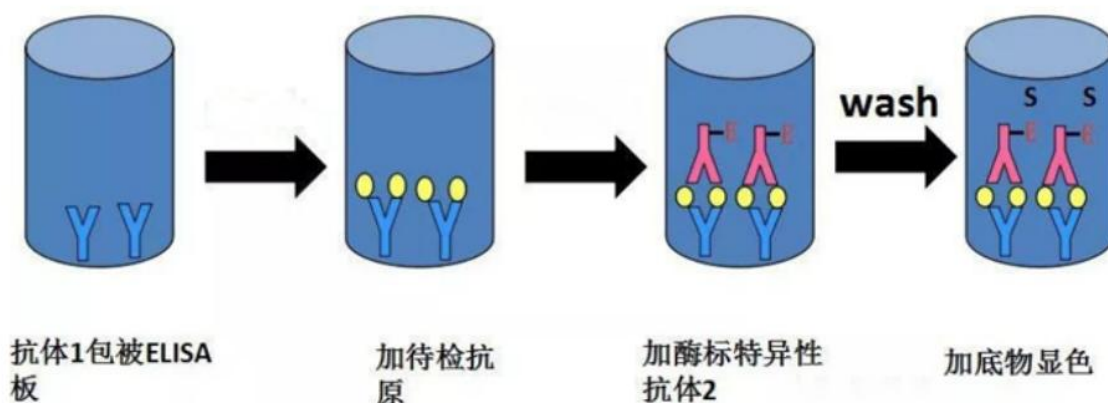
技术电话：15260335612

公司网址：[www.ruixinbio.com](http://www.ruixinbio.com)

联系时请提供产品货号、生产日期（见盒签），以便我们更高效为您服务。

## 实验原理

本试剂盒采用双抗体夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)。在预包被抗人骨成型蛋白2(BMP-2)抗体(固相抗体)的微孔酶标板中,加入人骨成型蛋白2(BMP-2)校准品和待测样本,再加入另一株HRP标记的抗人骨成型蛋白2(BMP-2)抗体(酶标抗体),经过温育与充分洗涤,去除未结合的组分,在微孔板固相表面形成固相抗体-抗原-酶标抗体的夹心复合物。加底物A和B,底物在HRP催化下,产生蓝色产物,在终止液(2M 硫酸)作用下,最终转化为黄色,在酶标仪450nm波长上测定吸光度(OD值),吸光度(OD值)与待测样品中人骨成型蛋白2(BMP-2)的浓度正相关。拟合校准品曲线,可以计算出样本中人骨成型蛋白2(BMP-2)的浓度。



### 优点

高特异性: 涉及检测同一抗原上的不同表位的两种抗体。

适用于复杂样品。

高灵活性和灵敏度: 可使用直接和间接两种方法。

### 缺点

需要设计: 有时候很难找到针对同一靶标、能识别其不同表位并能很好地协同工作的两种抗体。

## 试剂盒组分与保存

未开封的试剂盒保存在 2-8 度，不得使用过期试剂盒。

组分	数量	主要成分	开封后储存
校准品	0.3ml/管	--	2-8℃14 天
包被微孔板	96T/48T	预包被固相抗体	2-8℃14 天
HRP 标记抗体	10mL	HRP 标记的检测抗体	2-8℃180 天
样本稀释液	6mL	--	2-8℃180 天
底物液 A	6mL	0.01%过氧化氢	2-8℃180 天
底物液 B	6mL	0.1%TMB	2-8℃180 天
终止液	6mL	2mol/L 稀硫酸	2-8℃180 天
20×浓缩洗涤液	25mL	0.05%Tween20	2-8℃180 天
说明书	1 份	--	--
自封袋	1 个	--	--
不干胶	2 片	--	--

校准品浓度依次为：2.5、5、10、20、40、80 ng/mL。

### 注意：

- 1: 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。
- 2: 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（不提供，但可协助购买）

- 1、酶标仪（450nm）
- 2、精密移液器及一次性吸头
- 3、蒸馏水
- 4、洗瓶或者自动洗板机
- 5、37℃水浴锅或恒温箱
- 6、500ml 量筒

### 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，过期产品不得使用。
  - 3、跟其他厂家的试剂盒或者组分不能混用。
  - 4、使用试剂盒配套的样品稀释液。
  - 5、如果样本值高于最高标准品浓度值，请将样本适当稀释后，再重新测定。
  - 6、待测样本中存在的人抗鼠等异嗜抗体会干扰检测结果，检测前，请排出该因素。
  - 7、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。

### 技术提示

- 1、混合蛋白溶液时，避免起泡。
- 2、加校准品与样本时，每个校准品浓度和样本都要更换移液枪头，公共组分应该悬臂加样，避免交叉污染。
- 3、合适的温育时间，和充分的洗涤步骤，是保证实验结果准确性的必要条件。
- 4、使用自动洗板机时，加入一个 30 秒浸泡的步骤，可以提高检测精度。
- 5、底物溶液为无色液体，保存过程中变为蓝色，代表底物溶液已经失效，不得使用。
- 6、终止液加样顺序与底物溶液加样顺序一致，加入终止液后，蓝色底物产物，会瞬间变为黄色。
- 7、实验中，用剩的板条，应立即放回自封袋中，密封（低温干燥）保存。
- 8、所有液体组分，使用前充分摇匀，严格按照说明书标明的时间、加样量及加样顺序进行温育操作。
- 9、

### 生物安全

- 1、检测必须符合实验室管理规范的规定，严格防止交叉污染，所有样品、洗弃液和各种废弃物都应按照传染物进行处置。
- 2、试剂盒的液体组分中，含有 proclin-300 防腐剂，可能引起皮肤过敏反应，避免吸入烟雾与皮肤接触。
- 3、底物液对皮肤、眼睛和上呼吸道有刺激作用，避免吸入烟雾。
- 4、戴上防护手套，实验完成后彻底洗手。

### 样品的采集和储存

---

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。

- 1、**细胞培养上清**：4000rpm 条件下离心 20min，去除细胞颗粒和聚合物，上清液保存在- 20℃ 以下，避免反复冻融。
- 2、**血清**：使用不含热原和内毒素的试管，操作过程中避免任何细胞刺激，4000rpm 条件下离心 20min，小心地分离出血清，保存在- 20℃ 以下，避免反复冻融。
- 3、**血浆**：肝素，EDTA，或柠檬酸钠作为抗凝剂。在 4000rpm 条件下，离心 20 分钟取上清，血浆保存在-20℃ 以下，避免反复冻融。

样本收集后，不是一次检测完，请按一次用量分装冻存，避免反复冻融，使用时在室温下解冻，确保样品均匀充分解冻。

- 4、**组织匀浆**：用预冷的 PBS (0.01 M, 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 1g 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) 加入玻璃匀浆器中，在冰上充分研磨。为了进一步裂解组织细胞，可以对匀浆液进行超声破碎或反复冻融。最后将匀浆液  $5000 \times g$  离心 5-10 分钟，取上清检测。
- 5、**细胞提取液**：贴壁细胞用冷的 PBS 轻轻清洗，然后用胰蛋白酶消化， $1000 \times g$  离心 5 分钟后收集细胞；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  $1 \times 10^6$  个细胞中加入 150-200  $\mu$ L PBS 重悬并通过反复冻融使细胞破碎(若含量很低可减少 PBS 的体积)。将提取液于  $1500 \times g$  离心 10 分钟，取上清检测。
- 6、**其他生物体液**：  $1000 \times g$  离心 20 分钟，除去杂质及细胞碎片。取上清检测。

## 试剂准备

- 1、使用前，所有的组分都要至少复温 120min，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。
- 3、**底物**：底物液 A 和 B，在使用前，按 1:1 体积充分混合，混合后 15 分钟内使用。

## 操作程序

所有试剂和组分都先恢复到室温，标准品、质控品和样品，建议做复孔。

1、按前面说明书描述的方法，配制好试剂盒各种组分的工作液。

2、从铝箔袋中取出所需板条，剩余的板条用自封袋密封放回冰箱。

设置标准品孔、0 值孔、空白孔和样本孔，标准品孔各加不同浓度的标准品 50  $\mu$  L，0 值孔加样本稀释液 50  $\mu$  L，空白孔不加，样本孔加待测样本 50  $\mu$  L。

3、除空白孔外，标准品孔、0 值孔和样本孔，加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的检测抗体 100  $\mu$  L。

4、用封板膜盖住反应板，37 $^{\circ}$ C 水浴锅或恒温箱温育 60min。

5、揭开封板膜，弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液，静置 20S，甩去洗涤液，吸水纸上拍干，如此重复 5 次。若使用自动洗板机，请按洗板机操作程序进行洗板，添加浸泡 30s 的程序，可以提高检测的精度。洗板结束，加底物前，要在干净不掉屑的纸上，充分拍干反应板。

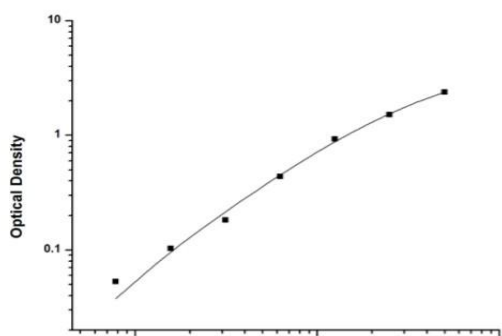
6、将底物 A 和 B 按 1:1 体积充分混合，所有孔中加入底物混合液 100  $\mu$  L。用封板膜盖住反应板，37 $^{\circ}$ C 水浴锅或恒温箱温育 15min。

7、所有孔加入终止液 50  $\mu$  L，在酶标仪 450nm 波长下读取各孔吸光度（OD 值）。

## 结果计算

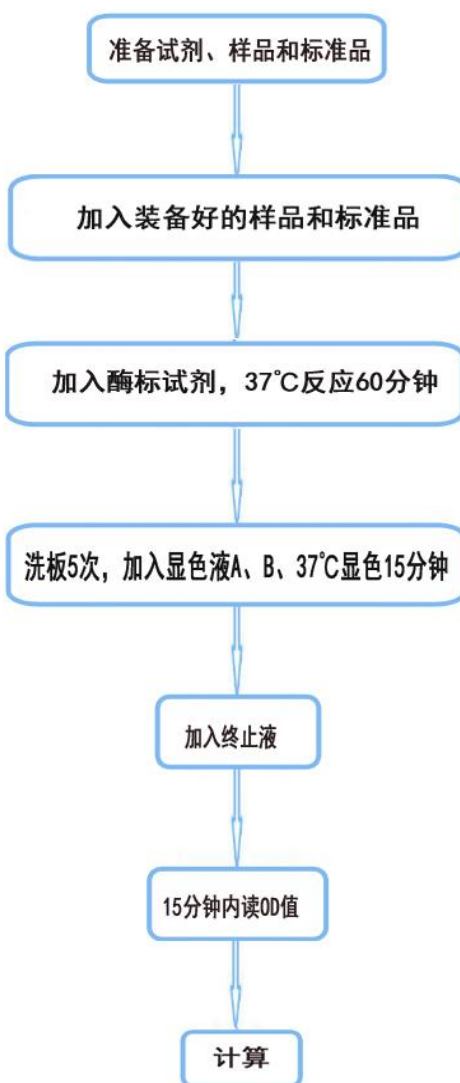
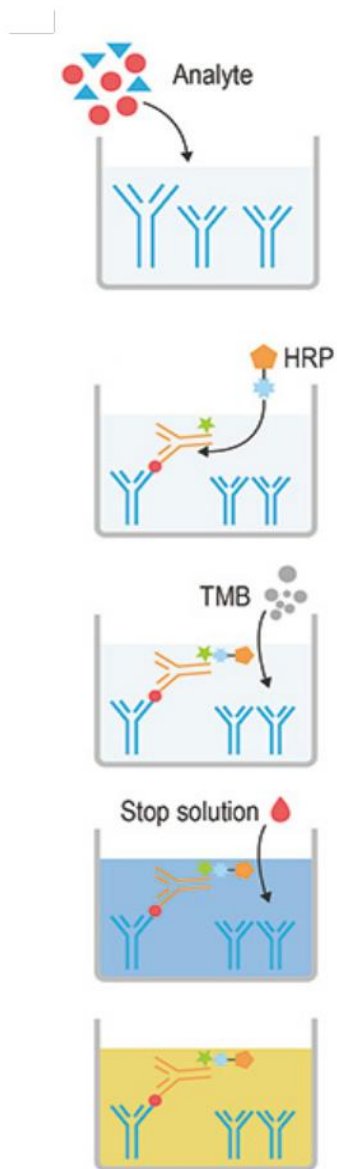
10、以标准品浓度做为横坐标，对应的吸光度（OD 值）作为纵坐标，利用计算机软件，采用四参数 Logistic 曲线拟合（4-pl），创建标准曲线方程，通过样品的吸光度（OD 值），利用方程计算样品的浓度值。【用 ELISA Calc 软件计算】

11、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。



(示意图，仅供参考)

## 操作程序



---

## 试剂盒性能指标

### 1、物理性能

试剂盒的各液体组分应澄清透明、无沉淀或者絮状物。微孔板铝箔袋应真空包装，无破损漏气。

### 2、剂量反应曲线线性

校准品剂量反应曲线相关系数  $r$  值，大于等于 0.9900。

### 3、精密度

批内精密度：三组已知的高、中、低浓度样品，进行二十次在同一个板块内精度评估。批内变异系数 CV% 小于 10%。

批间精密度：三组已知的高、中、低浓度样品，进行二十次在不同板块内精度评估。批间变异系数 CV% 小于 15%。

### 4、灵敏度

最低检出剂量小于 0.1 ng/mL。

### 5、回收率

三组已知的高、中、低浓度样品，进行五次在同一个板块内回收率评估，回收率在 85%-115% 之间。

### 6、特异性

本试剂盒识别天然和重组人骨成型蛋白 2 (BMP-2)，与结构类似物无交叉。

### 7、稳定性

2°C-8°C 保存，有效期 6 个月。

### 8、检测范围

2.5 ng/mL - 80 ng/mL。



## [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
	标准品未完全混匀	溶解标准品时稍微旋转瓶身，轻轻混匀使液体完全混匀
	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. 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。
3. 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。
4. 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。
5. 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。
6. 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。
7. 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。
8. 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。