



# ClinMax™ 人促红细胞生成素（EPO）定量测定 试剂盒（ELISA）

货号：CEA-C027

规格：96 tests

**重要提示：在进行实验之前请仔细阅读本手册。  
本试剂盒仅用于科研使用，不可用于诊断或治疗应用。**

## 目录

背景介绍.....	1
检测原理.....	1
注意事项.....	1
试剂盒组分.....	1
需要但未提供的试剂/设备.....	2
样品收集和储存.....	2
试剂储存条件及期限说明.....	2
试剂制备.....	3
检测流程.....	3
结果解读.....	4
使用注意事项.....	5
流程指南.....	6
典型数据.....	7
常见问题指南.....	12

生产企业：百斯医学诊断科技（北京）有限公司

生产地址：北京经济技术开发区永昌北路3号永昌工业园3号楼8106-8107

电话：010-67855298-8147

邮箱：IVD.AcroDiagnostics@acrobiosystems.com

销售企业：北京百普赛斯生物科技股份有限公司

地址：北京经济技术开发区宏达北路8号5号楼4层

电话：400-682-2521（全国） 010-53681107（北京）

邮箱：order.cn@acrobiosystems.com

## 背景介绍

该试剂盒用于定量检测人血清和血浆中促红细胞生成素（Erythropoietin, EPO）的浓度。试剂盒仅供科研使用。

## 检测原理

该试剂盒采用标准夹心酶联免疫吸附技术定量检测人促红细胞生成素（EPO）的浓度。用抗人 EPO 抗体包被于酶标板上，实验时样品或标准品中的人 EPO 会与包被抗体结合，游离的成分被洗去。依次加入生物素化的抗人 EPO 抗体和辣根过氧化物酶标记的亲合素。抗人 EPO 抗体与结合在包被抗体上的人 EPO 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 和 630nm 波长处测 OD 值，EPO 浓度与 OD 值之间呈正比，通过绘制标准曲线计算出样品中 EPO 的浓度。

## 注意事项

1. 本试剂盒仅供研究使用，不可用于诊断或治疗应用。
2. 不要将试剂与其他批次或来源的试剂混合或替换。
3. 如果样品产生的值高于最高标准，用适当的校准稀释剂稀释样品并重复测定。

## 试剂盒组分

表1. 试剂盒组分

货号	组分名称	规格 (96 tests)	形态	储存条件	
				未开封	已开封
CEA027-C01	Pre-coated Anti-EPO Antibody Microplate	1 plate	固态	2~8 °C	2~8 °C
CEA027-C02	Human EPO Standard	3392 IU×2	冻干粉	2~8 °C	-70°C
CEA027-C03	Biotin-Anti-EPO Antibody Con. Solution	100 µL	液态	2~8 °C	2~8 °C
CEA027-C04	Biotin-Antibody Dilution Buffer	8 mL	液态	2~8 °C	2~8 °C
CEA027-C05	Streptavidin-HRP Con. Solution	500 µL	液态	2~8 °C	2~8 °C
CEA027-C06	HRP Dilution Buffer	15 mL	液态	2~8 °C	2~8 °C
CEA027-C07	20× Washing Buffer	50 mL	液态	2~30 °C	2~30 °C
CEA027-C08	Sample Dilution Buffer	15 mL×2	液态	2~8 °C	2~8 °C
CEA027-C09	Substrate Solution	12 mL	液态	2~8 °C	2~8 °C
CEA027-C10	Stop Solution	6 mL	液态	2~30 °C	2~30 °C

## 需要但未提供的试剂/设备

带450nm或630nm滤光片的单波长或双波长酶标仪；

离心机；

10  $\mu$ L, 200  $\mu$ L 和 1000  $\mu$ L 精密移液器；

10  $\mu$ L, 200  $\mu$ L 和 1000  $\mu$ L 移液器吸头；

多道移液器；

离心管；

量筒；

超纯水或去离子水或蒸馏水。

## 样品收集和储存

下面列出的样品收集和储存条件旨在作为一般指南。样品稳定性尚未评估。

**血清** - 使用血清分离管（SST）并让样品在室温下凝结30分钟，然后以1000  $\times$ g离心15分钟。立即取出血清并进行检测。

**血浆** - 使用 EDTA、肝素或柠檬酸盐作为抗凝剂收集血浆。在收集后30分钟内以1000  $\times$ g离心15分钟。立即测定。

**样本储存** - 样本收集后24h内如无法测定，应在-20°C或更低的温度下冷冻，可稳定六个月。样品允许冻融一次。

## 试剂储存条件及期限说明

未开封的试剂盒自生产之日起可在 2°C~8°C下稳定保存 12 个月。

已开封的试剂盒应按照表 1 进行储存。保质期为自打开之日起 30 天。

**注意：** a. 不要使用过期的试剂。

b. 有效期在包装上查看。

## 试剂制备

使用前将所有试剂和样品置于室温（18°C~25°C）。如果在缓冲溶液中形成晶体，请将样品置于 37°C 培养箱中，直至晶体完全溶解，然后在使用前将溶液恢复至室温。

按照表 2 建议，用超纯水将所提供的冻干品配制成存储溶液，在室温下溶解 15 至 30 分钟，轻轻吹吸混匀，避免剧烈摇动或涡旋。重构的存储液应在 -70°C 保存，建议冻融次数不要超过 1 次，分装规格不低于 1696 IU。

表2. 配制方法

货号	组分名称	规格 (96 tests)	存储液浓度	重构水体积
CEA027-C02	Human EPO Standard	3392 IU	3392 IU/mL	1 mL

## 检测流程

### 1. 工作液配制

#### 1.1 制备 1×Washing Buffer

用超纯水/去离子水/蒸馏水将 50 mL 20×Washing Buffer 稀释至 1000 mL。

#### 1.2 制备 Biotin-Anti-EPO Antibody Solution

取 60 μL Biotin-Anti-EPO Antibody Con. Solution 加入 6 mL Biotin-Antibody Dilution Buffer，轻轻摇匀，现用现配。

#### 1.3 制备 EPO Streptavidin-HRP Solution

取 240 μL Streptavidin-HRP Con. Solution 加入 12 mL HRP Dilution Buffer，轻轻摇匀，现用现配。

### 2. 制备标准曲线

复溶后标准品（CEA027-C02）的浓度为 3392 IU/mL，取 10 μL 的标准品储存液，加入到 990 μL 的样本稀释液（Sample Dilution Buffer）中，标记为 Cm。准备 6 个离心管，分别标记为 C1，C2，C3，C4，C5，C6。标准曲线配置如下：在 C1 管中加入 15 μL Cm 溶液以及 2385 μL 样本稀释液，作为标准曲线的最高点 C1（212 mlU/mL），充分振荡混匀后；在 C2 管中加入 500 μL C1 溶液以及 1000 μL 样本稀释液，作为标准曲线的 C2（70.76 mlU/mL），后续按照此方法继续依次 1: 2 稀释至 23.56 mlU/mL，7.85 mlU/mL，2.62 mlU/mL，0.87 mlU/mL，共配 6 个标准曲线浓度点，曲线范围为：212 mlU/mL 至 0.87 mlU/mL。以稀释液作为标准曲线的零浓度。

### 3. 加入样品和生物素抗体溶液

每孔加入 50  $\mu$ L EPO standards, 或 50  $\mu$ L 样品, 最后每孔加入 50  $\mu$ L Biotin-Anti-EPO Antibody Solution, 用密封膜密封微孔板, 在室温 (18°C~25°C) 下孵育 2.0 小时。

### 4. 洗涤

吸出剩余溶液, 向每个孔中加入 300  $\mu$ L 1×Washing Buffer, 轻轻敲击板 1 分钟, 去除任何剩余的 1×Washing Buffer: 通过吸出或倾倒, 倒置板并用纸巾吸干。重复上述洗涤步骤五次。

### 5. 加入 EPO Streptavidin-HRP Solution

向微孔板中加入 100  $\mu$ L EPO Streptavidin-HRP Solution。用密封膜密封微孔板, 在室温 (18°C~25°C) 下孵育 30 分钟, 避光。

### 6. 洗涤

重复步骤 4。

### 7. 底物液

每孔加入 100  $\mu$ L 底物溶液, 用密封膜密封微孔板并在室温 (18°C~25°C) 下孵育 15 分钟, 避光。

### 8. 终止液

向每个孔中加入 50  $\mu$ L 终止溶液, 轻轻敲击板以充分混合。终止反应后, 十分钟内上机读数。

**注意:** 孔中的颜色应从蓝色变为黄色。

### 9. 数据记录

使用 UV/Vis 微孔板分光光度计读取 450nm 和 630nm 处的吸光度。

**注意:** 为了减少背景噪音, 用 450nm 读取的值减去 630nm 读取的值。

#### 结果解读

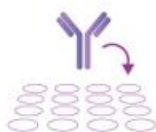
1. 标准曲线的范围:  $R^2 \geq 0.9900$ 。
2. 如果待测样品的 OD 值高于最高标准, 应将样品用稀释缓冲液稀释后重复测定。
3. 校准标准曲线得到的吸光度值, 以标准浓度为 x 轴, 校准吸光度值为 y 轴绘制标准曲线。  
四参数拟合用于绘制标准曲线并计算样品浓度。

## 使用注意事项

1. 所有化学品都应被视为具有潜在危险。因此，我们建议仅由受过实验室技术培训的人员处理本产品，并按照良好实验室规范的原则使用本产品。穿戴合适的防护服，例如实验室工作服、安全眼镜和手套。应注意避免接触皮肤或眼睛。在接触皮肤或眼睛的情况下立即用水清洗。有关具体建议，请参阅材料安全数据表和/或安全声明。
2. 请勿使用超过标签上有效期的试剂盒试剂。
3. 为避免可能导致测试无效的试剂或样本的微生物污染或交叉污染，请使用一次性移液器吸头和/或移液器。
4. 使用干净的专用试剂托盘分配结合物和底物试剂。
5. 试剂制备必须使用蒸馏水或去离子水。
6. 应按照提供的说明使用本试剂盒。
7. 不同批次试剂不要混用。
8. 使用前将所有试剂和样品置于室温（18°C~25°C）。如果在缓冲溶液中形成晶体，则孵育直至晶体完全溶解。使用前，将溶液恢复至室温。
9. 试剂盒应该保存在 2°C~8°C。

## 流程指南

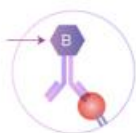
## Quick Guide



1

**Prepare**

Prepare all reagents, standard curve, and samples as instructed.



2

**Sample & detection antibody**

Add test sample mix to wells. (Calibrator, samples, Biotin-Ab Solution)

↓ 18-25°C 2.0 hour

Remove liquid and wash plate



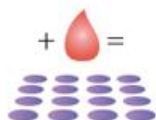
3

**Streptavidin-HRP Solution**

Add enzyme conjugated Streptavidin

↓ 18-25°C 30 min avoid light

Remove liquid and wash plate

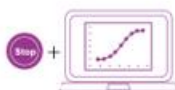


4

**Substrate Reaction**

Colorimetric substrate is added to the wells and will form a colored solution when catalyzed by the enzyme.

↓ 18-25°C 15 min avoid light



5

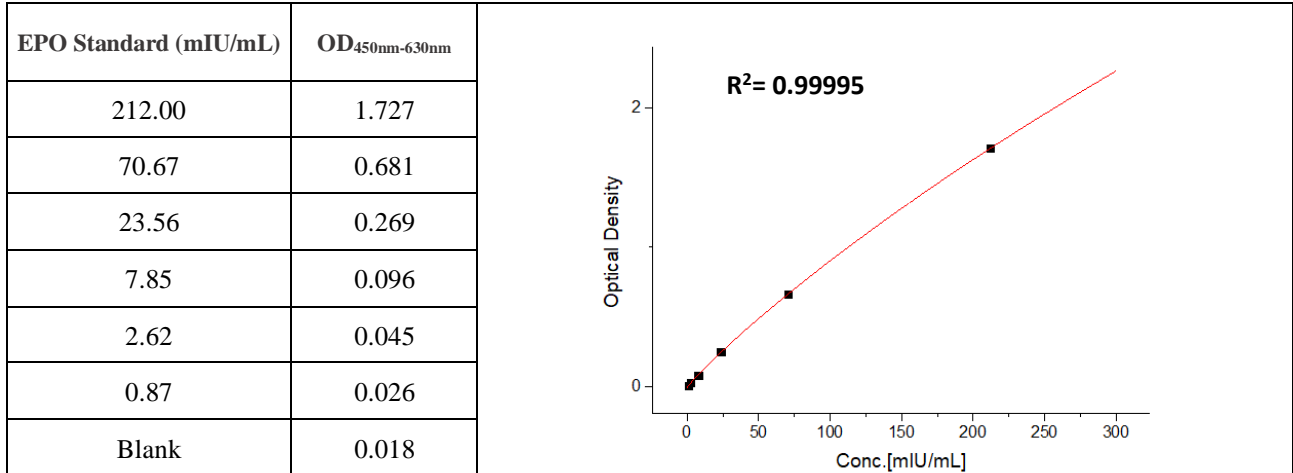
**Termination + Analysis**

Add Stop solution and read absorbance at 450nm and 630nm using UV/Vis microplate spectrophotometer.



## 典型数据

**注意:** 以下数据仅供参考。根据标准曲线的结果计算样品浓度。

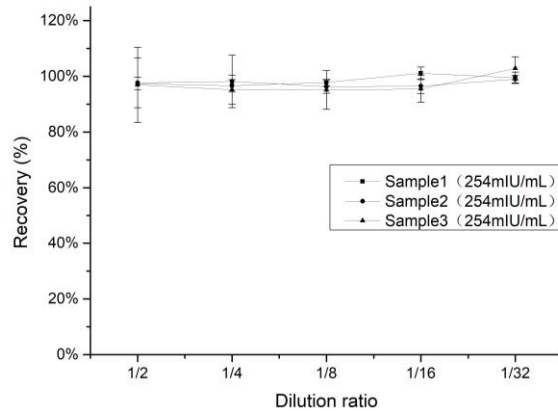


### 1. 灵敏度

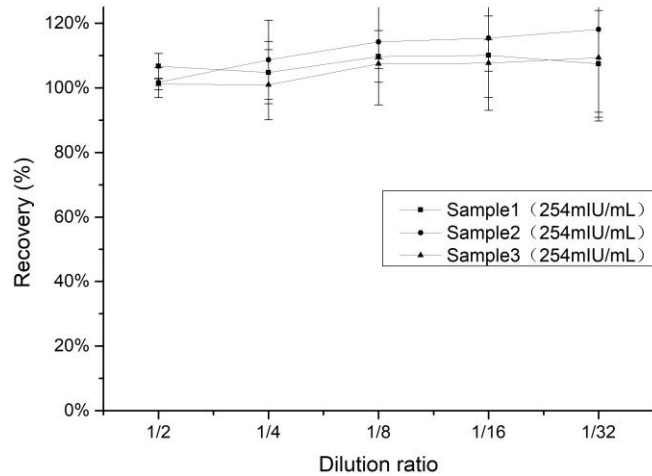
检测零浓度校准品 20 次，得到 20 次测定结果的 OD 值，计算其平均值 M 和标准差 SD，将 M+2SD 所对应的 OD 值，带入标准曲线中，计算得出对应的浓度，即最低检测限(Limit of blank, LOB)。EPO 最低可检测限浓度小于 0.67 mIU/mL。

## 2. 稀释线性

将三份高值 EPO 加标血清样本（浓度为 254 mIU/mL）按 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32 进行稀释，测定在线性范围内样品的值。从血清样本中平均可检测到 97.72% 的 EPO 蛋白。



将三份高值 EPO 加标血浆（EDTA）样本（浓度为 254 mIU/mL）按 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32 进行稀释，测定在线性范围内样品的值。从血浆样本中平均可检测到 108.25% 的 EPO 蛋白。



### 3. 特异性

当该试剂盒用于分析高达 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下的重组细胞因子时，未观察到交叉反应。

<b>Human</b>	IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12 p70, IL-10, IL-10, MCP-1, M-CSF, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$
--------------	---

### 4. 批内差

同一批试剂中测试含有 4 个不同浓度的 EPO 样品，每个样本检测十次，批内精密性 CV < 10%。

Sample Concentration (mIU/mL)	Mean (mIU/mL)	SD	Numbers	CV
101	114.3526	4.571078	10	4%
25.4	28.30166	0.7577	10	3%
12.7	13.49605	0.378961	10	3%
6.35	6.506036	0.344566	10	5%

### 5. 批间差

对 5 个不同浓度的 EPO 样品进行 3 个批次测试，每个批次 5 个样本浓度、每个浓度检测 3 次，批间精密性 CV < 15%。

Sample Concentration (mIU/mL)	Mean (mIU/mL)	SD	Numbers	CV
212	212.1596917	0.149100335	9	0.07%
70.67	70.59590667	0.056852205	9	0.08%
23.56	23.62422667	0.130880068	9	0.55%
7.85	7.716932778	0.123343872	9	1.60%
2.62	2.642397778	0.095445041	9	3.59%

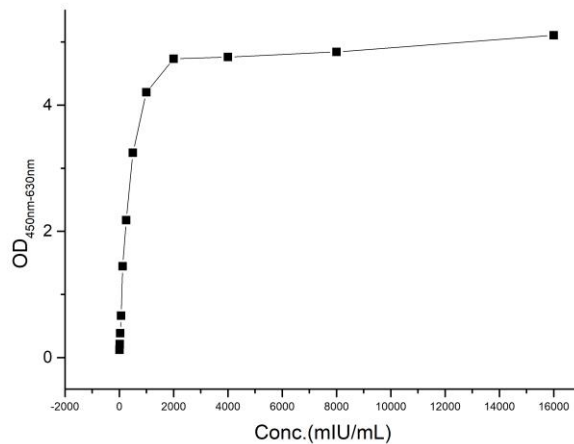
## 6. 回收率

将重组人 EPO 蛋白按照 1: 9 的稀释比例加标到 3 份人血清样品中, 然后进行分析。从血清样本中平均回收了 93.72% 的 EPO 蛋白。

Sample ID	Conc Measured (mIU/mL)	Conc Added (mIU/mL)	Conc Recovered (mIU/mL)	Recovery
1	26.61	21.00	19.12	91.07%
	13.50	6.35	6.01	94.71%
	8.32	-		
2	27.71	21.00	18.39	87.56%
	15.50	6.35	6.18	97.36%
	10.35	-		
3	24.55	21.00	18.65	88.81%
	12.43	6.35	6.53	102.82%
	6.55	-		

## 7. 钩状效应

EPO 浓度高于 2000mIU/ml 不影响检测结果。



## 8. 干扰实验

血红蛋白（模拟溶血）浓度不大于 2% ，甘油三酯（模拟脂血）浓度不大于 3.0g/L，不影响检测结果。

Spiked Material	ID	Conc-1(mIU/mL)	Conc-2(mIU/mL)	Mean(mIU/mL)	Recovery
2% Hemoglobin (v/v)	Sample 1	11.25	10.69	10.97	98%
	Spiked Sample 1	10.56	10.89	10.73	
	Sample 2	10.64	9.80	10.22	90%
	Spiked Sample 2	9.44	9.00	9.22	
	Sample 3	2.62	2.91	2.76	110%
	Spiked Sample 3	3.11	2.95	3.03	
	Sample 4	3.76	3.56	3.66	106%
	Spiked Sample 4	4.13	3.64	3.89	

Spiked material	ID	Conc-1 (mIU/mL)	Conc-2 (mIU/mL)	Mean (mIU/mL)	Recovery
Triglyceride (3 mg/mL)	Sample 1	11.25	10.69	10.97	117%
	Spiked Sample 1	12.66	12.95	12.81	
	Sample 2	10.64	9.80	10.22	92%
	Spiked Sample 2	9.80	8.96	9.38	
	Sample 3	2.62	2.91	2.76	104%
	Spiked Sample 3	2.95	2.79	2.87	
	Sample 4	3.76	3.56	3.66	89%
	Spiked Sample 4	3.28	3.28	3.28	

## 9. 样本值

在该测定中，进行了 54 例人血清样本中 EPO 浓度检测，54 个样品测量值介于 0.87 和 212 mIU/mL 之间。

## 常见问题指南

问题	原因	解决方法
标准曲线差	* 移液不准确	* 检查移液器
CV 值偏高	* 移液不准确 * 孔中有气泡	* 检查移液器 * 去除孔中的气泡
背景高	* 板子清洗不充分 * 洗涤缓冲液被污染	* 按操作步骤正确清洗 * 制备新的洗涤缓冲液
整板读数偏低	* 波长选择错误 * 孵育时间不足	* 检查波长参数 * 增加孵育时间
标准曲线正常，样品读 值高	* 样本中的细胞因子水平高于检测 范围	* 稀释样本再次进行检测
曲线漂移	* 加样时间过长 * 试剂不在室温下	* 在检测开始之前准备好所有的标准品和样品，尽 量控制加样时间 * 除非抗体等物质有特殊说明，否则在加样前所有 试剂都处于室温状态