# Human MUC6/Mucin-6 ELISA Instructions

## CAT：EH0344

## 组分

| | CAT | Volume |
|---|---|---|
| ❶ CP (Coated Plate) | EH0344CP | 96 well |
| ❷ S (Standard) | EH0344S | 2 vial |
| ❸ SD (Sample Diluent) | ESD10 | 15 ml/bottle |
| ❹ DA (Detect Antibody) | EH0344DA | 6 ml/bottle |
| ❺ SH (Streptavidin-HRP) | ESH01 | 12 ml/bottle |
| ❻ AB (Assay Buffer 1×) | EAB01 | 12 ml/bottle |
| ❼ TS (TMB Substrate) | ETS01 | 12 ml/bottle |
| ❽ SS (Stop Solution) | ESS01 | 12 ml/bottle |
| ❾ WB (Wash Buffer 10×) | EWB01 | 50 ml/bottle |
| ❿ SF (Sealer Film) | ESF01 | 6 pieces |

■ 注: 试剂盒打开后，各组分可稳定 30 天。

## 试剂准备

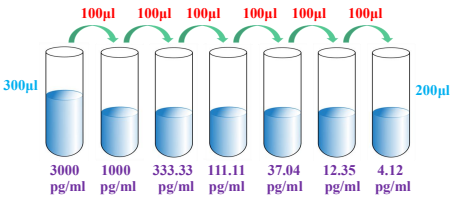
### ■ 标准曲线的制作:

**样本稀释液（SD）**用于血清和血浆样本检测。其他样品类型，使用样本制备缓冲液（SPB，样品制备缓冲液）制备标准曲线，例如细胞培养上清液，组织研磨液，细胞裂解物等。尿液样品使用 AB（检测缓冲液）制备标准曲线。

按 S 瓶标签标注体积加入蒸馏水制备人 MUC6/Mucin-6 高标准（10000 pg/ml）。轻旋混合以确保完全溶解。

高标准静置 10-30 min，稀释前充分混合。

人 MUC6/Mucin-6 标准 EH0344S 30000 pg/ml 30 µl + 270 µl SPB 作为高标准（3000 pg/ml）。每个稀释试管中加入 200 µl SPB，使用高标准制备 1：2 稀释系列。在进行下一步转移之前彻底混合每个试管。SPB 用作零标准（0 pg/ml）。




### ■ 1×洗液制备

吸取 10×浓缩洗液 50 ml 至 500 ml 量筒，加蒸馏水或去离子水至 500 ml，轻轻混匀。转移至干净瓶内。2-25℃贮存。

## 检测步骤

**检测之前请将所有的试剂、样本恢复至室温**

❶ 准备好所有需要的试剂及工作浓度标准品。

❷ 将不需要的**板条**拆卸下来，放回铝箔袋，重新封好封口。

❸ 每孔加入 50 µl **检测缓冲液（AB）**。

❹ 加入 50 µl 或 10 µl 的**标准品（S）**、**样本**。保证连续加样，请不要间断。加样过程在 15 分钟内完成。

❺ 每孔加入 50 µl **检测抗体（DA）**。

❻ 使用**封板膜（SF）**封板。500 转/分钟振荡，室温孵育 1 小时。

❼ 弃掉孔内液体，每孔加入 300 µl **洗液**洗板，洗涤 4 次。每次洗板，在吸水纸上拍干。为获得理想的实验性能，必须彻底移除残留液体。

❽ 加入 100 µl **辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素（SH）**。

❾ 使用新的**封板膜（SF）**封板。500 转/分钟振荡，室温(18-25℃)孵育 30 分钟.

❿ 重复步骤 7。

⓫ 每孔加入 100 µl **显色底物 TMB（TS）**，室温孵育 5-30 分钟。

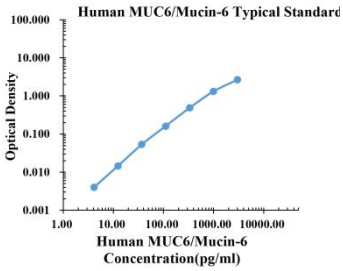
⓬ 每孔加入 100 µl **终止液（SS）**。

⓭ 在 30 分钟之内，**酶标板** 450 nm 波长测定 OD 值，校正波长设定为 570 nm 或者 630 nm。


**攸克生命科学技术（杭州）有限公司**

## 典型数据

每一次的检测，每一块微孔板都必须设立标准曲线。下方标准曲线仅作为示例展示。




| pg/ml | O.D. | | Average | Corrected |
|---|---|---|---|---|
| 0.00 | 0.0057 | 0.0057 | 0.0057 | |
| 4.12 | 0.0100 | 0.0094 | 0.0097 | 0.0040 |
| 12.35 | 0.0209 | 0.0196 | 0.0203 | 0.0146 |
| 37.04 | 0.0598 | 0.0585 | 0.0592 | 0.0535 |
| 111.11 | 0.1701 | 0.1647 | 0.1674 | 0.1617 |
| 333.33 | 0.4992 | 0.4846 | 0.4919 | 0.4862 |
| 1000.00 | 1.3210 | 1.3120 | 1.3165 | 1.3108 |
| 3000.00 | 2.6780 | 2.6400 | 2.6590 | 2.6533 |

## 灵敏度

人 MUC6/Mucin-6 的最低可检测浓度为 0.31 pg/ml（50 μl 上样量）或 3.33 pg/ml（10 μl 上样量）。

10 个零浓度空白值 OD 的平均值加上两个 SD，计算最低可检测浓度。

## 精密度

■ 酶标板内精密度：3 个已知浓度的样本酶标板内重复测定 22 次，评估酶标板内的精密度。

■ 酶标板间精密度：3 个已知浓度的样本酶标板间重复检测 6 次，评估酶标板间的精密度。

| | 酶标板内精密度 | | | 酶标板间精密度 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 样本数量 | S1 | S2 | S3 | S1 | S2 | S3 |
| | 22 | 22 | 22 | 6 | 6 | 6 |
| 平均值（pg/ml） | 39.8 | 263.0 | 850.8 | 42.6 | 264.9 | 868.6 |
| 标准差 | 2.1 | 11.1 | 54.5 | 2.2 | 13.2 | 30.8 |
| 变异系数（%） | 5.2 | 4.2 | 6.4 | 5.2 | 5.0 | 3.5 |

## 回收率

健康人血清加入 3 个不同浓度水平的人 MUC6/Mucin-6，未加入人 MUC6/Mucin-6 的血清作为本底，计算回收率。

回收率的范围从 78%至 112%，平均回收率为 96%。

## 稀释线性

5 份健康人血清加入高浓度的人 MUC6/Mucin-6，并在标准曲线的动力学范围内进行系列稀释，评估检测的线性。

线性范围为 89%至 109%，总体平均回收率为 95%。

## 样本值

应用本试剂盒，检测 30 份健康人的血清样本。

| 样本类型 | 检测样本数量 | 浓度范围 (pg/ml) | 可测百分率 (%) | 可测样本平均浓度 (pg/ml) |
|---|---|---|---|---|
| 血清 | 30 | n.d. | 0 | n.d. |

n. d. =测不到浓度值。样本的浓度值低于灵敏度被认为测不到浓度值。