



Human Antithrombin III/ATIII ELISA Instructions

CAT: EHY0196

组分

| | CAT | Volume |
|-----------------------------------|-----------------|--------------|
| ① CP (Coated Plate) | EHY0196CP | 96 well |
| ② S (Standard) | EHY0196S1~S7,S0 | 8 vial |
| ③ SD (Sample Diluent) | ESD01 | 15 ml/bottle |
| ④ DD (Detect Antibody Diluent) | EDD02 | 6 ml/bottle |
| ⑤ DA-H (Detect Antibody-HRP 100×) | EHY0196DA-H | 50μl/vial |
| ⑥ AB (Assay Buffer 1×) | EAB01 | 12 ml/bottle |
| ⑦ TS (TMB Substrate) | ETS01 | 12 ml/bottle |
| ⑧ SS (Stop Solution) | ESS01 | 12 ml/bottle |
| ⑨ WB (Wash Buffer 10×) | EWB01 | 50 ml/bottle |
| ⑩ SF (Sealer Film) | ESF01 | 6 pieces |

■ 注：试剂盒打开后，各组分可稳定 30 天。

样本稀释

血清、血浆等样本需用样品稀释液稀释 1600 倍。分两次稀释，建议每次 5 μl 样本+ 195 μl 样本稀释液。

试剂准备

■ 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。

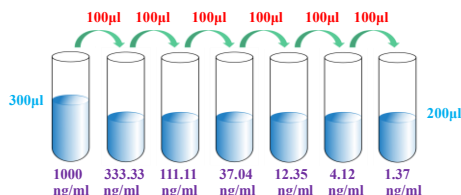
■ 1×检测抗体制备

稀释前充分混合。

根据标准品和样品的需要，用 DD（检测抗体稀释液）在干净的塑料管中对浓缩的检测抗体溶液进行 1:100 稀释。

■ 标准曲线的制作：

S1 至 S7 和 S0 直接用于血清和血浆样本检测。



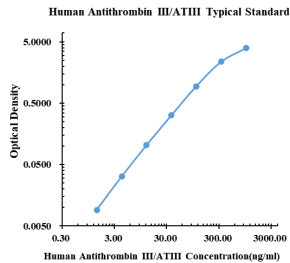
检测步骤

检测之前请将所有的试剂、样本恢复至室温

- ① 准备好所有需要的试剂及工作浓度标准品。
- ② 将不需要的板条拆卸下来，放回铝箔袋，重新封好封口。
- ③ 每孔加入 50 μl 检测缓冲液（AB）。
- ④ 加入 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。
- ⑤ 每孔加入 50 μl 检测抗体标记的链霉亲和素（DA-H）。
- ⑥ 使用封板膜（SF）封板。500 转/分钟振荡，室温孵育 30 分钟。
- ⑦ 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。
- ⑧ 每孔加入 100 μl 显色底物 TMB（TS），室温孵育 5~30 分钟。
- ⑨ 每孔加入 100 μl 终止液（SS）。
- ⑩ 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。

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。



| ng/ml | O.D. | Average | Corrected |
|---------|--------|---------|-----------|
| 0.00 | 0.0114 | 0.0110 | 0.0112 |
| 1.37 | 0.0200 | 0.0207 | 0.0204 |
| 4.12 | 0.0413 | 0.0449 | 0.0431 |
| 12.35 | 0.1168 | 0.1128 | 0.1148 |
| 37.04 | 0.3379 | 0.3194 | 0.3287 |
| 111.11 | 0.9453 | 0.9712 | 0.9583 |
| 333.33 | 2.3420 | 2.4280 | 2.3850 |
| 1000.00 | 3.9570 | 3.9835 | 3.9703 |
| | | | 3.9591 |

灵敏度

人 Antithrombin III/ATIII 的最低可检测浓度为 0.32 ng/ml (10 μ l 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 20 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 (ng/ml) | 22.4 | 108.9 | 363.2 | 19.3 | 98.4 | 338.4 |
| 标准差 | 1.1 | 5.2 | 17.4 | 0.4 | 2.2 | 8.7 |
| 变异系数 (%) | 5.0 | 4.7 | 4.8 | 1.9 | 2.2 | 2.6 |

回收率

健康人血清加入 3 个不同浓度水平的人 Antithrombin III/ATIII，未加入人 Antithrombin III/ATIII 的血清作为本底，计算回收率。
回收率的范围从 83%至 117%，平均回收率为 101%。

稀释线性

5 份健康人血清加入高浓度的人 Antithrombin III/ATIII，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 86%至 113%，总体平均回收率为 99%。

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 (μg/ml) | 可测百分率 (%) | 可测样本平均浓度 (μg/ml) |
|------|--------|---------------|-----------|------------------|
| 血清 | 30 | 169.32-423.79 | 100 | 306.49 |

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。