

胰蛋白酶原 II ELISA 试剂盒说明书

实验原理:

本试剂盒应用双抗体夹心法测定标本中血清素/血清胺(ST)水平。用纯化的血清素/血清胺(ST)抗体包被微孔板,制成固相抗体,往包被单抗的微孔中依次加入血清素/血清胺(ST),再与 HRP 标记的血清素/血清胺(ST)抗体结合,形成抗体-抗原-酶标抗体复合物,经过彻底洗涤后加底物 TMB 显色。TMB 在 HRP 酶的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的血清素/血清胺(ST)呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度(OD 值),通过标准曲线计算样品中血清素/血清胺(ST)浓度。

试剂盒性能:

1. 灵敏度: zui 小的检测浓度小于 1 号标准品。稀释度的线性。样品线性回归与预期浓度相关系数 R 值为 0.990。
2. 特异性: 不与其它细胞因子反应。
3. 重复性: 板内、板间变异系数均小于 10%。

特点:

- 1、高效、灵敏、特异的抗体;
- 2、稳定的重复性和可靠性;
- 3、吸附性能好,空白值低,孔底透明度高的固相载体;
- 4、适用血清、血浆、组织匀浆液、细胞培养上清液、尿液等多种标本类型。

标本要求:

1. 标本采集后尽早进行提取,提取按相关文献进行,提取后应尽快进行实验。若不能马上进行试验,可将标本放于-20℃保存,但应避免反复冻融。
2. 不能检测含 NaN₃ 的样品,因 NaN₃ 抑制辣根过氧化物酶的(HRP)活性。

样本处理及要求:

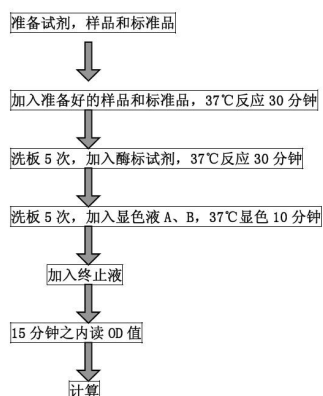
1. 血清: 室温血液自然凝固 10-20 分钟,离心 20 分钟左右(2000-3000 转/分)。仔细收集上清,保存过程中如出现沉淀,应再次离心。
2. 血浆: 应根据标本的要求选择 EDTA 或柠檬酸钠作为抗凝剂,混合 10-20 分钟后,离心 20 分钟左右(2000-3000 转/分)。仔细收集上清,保存过程中如有沉淀形成,应该再次离心。
3. 尿液: 用无菌管收集,离心 20 分钟左右(2000-3000 转/分)。仔细收集上清,保存过程中如有沉淀形成,应再次离心。胸腹水、脑脊液参照实行。
4. 细胞培养上清: 检测分泌性的成份时,用无菌管收集。离心 20 分钟左右(2000-3000 转/分)。仔细收集上清。检测细胞内的成份时,用 PBS (PH7.2-7.4) 稀释细胞悬液,细胞浓度达到 100 万/ml 左右。通过反复冻融,以使细胞破坏并放出细胞内成份。离心 20 分钟左右(2000-3000 转/分)。仔细收集上清。保存过程中如有沉淀形成,应再次离心。
5. 组织标本: 切割标本后,称取重量。加入一定量的 PBS, PH7.4。用液氮迅速冷冻保存备用。标本融化后仍然保持 2-8℃ 的温度。加入一定量的 PBS (PH7.4),用手工或匀浆器将标本匀浆充分。离心 20 分钟左右(2000-3000 转/分)。仔细收集上清。分装后一份待检测,其余冷冻备用。

标本采集后尽早进行提取,提取按相关文献进行,提取后应尽快进行实验。若不能马上进行试验,可将标本放于-20℃保存,但应避免反复冻融。

操作步骤:

1. 使用前,将所有试剂充分混匀。不要使液体产生大量的泡沫,以免加样时加入大量的气泡,产生加样上的误差。
2. 根据待测样品数量加上标准品的数量决定所需的板条数。每个标准品和空白孔建议做复孔。每个样品根据自己的数量来定,能使用复孔的尽量做复孔。标本用标本稀释液 1:1 稀释后加入 50u1 于反应孔内。
3. 加入稀释好后的标准品 50u1 于反应孔、加入待测样品 50u1 于反应孔内。立即加入 50u1 的生物素标记的抗体。盖上膜板,轻轻振荡混匀,37℃温育 1 小时。
4. 甩去孔内液体,每孔加满洗涤液,振荡 30 秒,甩去洗涤液,用吸水纸拍干。重复此操作 3 次。如果用洗板机洗涤,洗涤次数增加一次。
5. 每孔加入 80u1 的亲合链酶素-HRP,轻轻振荡混匀,37℃温育 30 分钟。

- 甩去孔内液体，每孔加满洗涤液，振荡 30 秒，甩去洗涤液，用吸水纸拍干。重复此操作 3 次。如果用洗板机洗涤，洗涤次数增加一次。
- 每孔加入底物 A、B 各 50ul，轻轻振荡混匀，37℃温育 10 分钟。避免光照。
- 取出酶标板，迅速加入 50ul 终止液，加入终止液后应立即测定结果。
- 在 450nm 波长处测定各孔的 OD 值。



结果判断与分析:

- 仪器值：于波长 450nm 的酶标仪上读取各孔的 OD 值
- 以吸光度 OD 值为纵坐标 (Y)，相应的 ES 标准品浓度为横坐标 (X)，做得相应的曲线，样品的 ES 含量可根据其 OD 值由标准曲线换算出相应的浓度。
- 检测值范围：0-240pg/ml
- 敏感度：0.1 pg/ml

操作注意事项:

- 试剂应按标签说明书储存，使用前恢复到室温。稀释过后的标准品应丢弃，不可保存。
- 实验中不用的板条应立即放回包装袋中，密封保存，以免变质。
- 不用的其它试剂应包装好或盖好。不同批号的试剂不要混用。保质前使用。
- 使用一次性的吸头以免交叉污染，吸取终止液和底物 A、B 液时，避免使用带金属部分的加样器。
- 使用干净的塑料容器配置洗涤液。使用前充分混匀试剂盒里的各种成份及样品。
- 洗涤酶标板时应充分拍干，不要将吸水纸直接放入酶标反应孔中吸水。
- 底物 A 应挥发，避免长时间打开盖子。底物 B 对光敏感，避免长时间暴露于光下。避免用手接触，有毒。实验完成后应立即读取 OD 值。
- 加入试剂的顺序应一致，以保证所有反应板孔温育的时间一样。
- 按照说明书中标明的时间、加液的量及顺序进行温育操作。