

印度刺猬因子定量试剂盒说明书

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。

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。

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。

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%。

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。
6. 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。
7. 每孔加入底物A、B各50u1,轻轻振荡混匀,37℃温育10分钟。避免光照。

8. 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。

9. 在 450nm 波长处测定各孔的 OD 值。

4、敏感度： 0.1 pg/ml

结果判断与分析：

1、仪器值：于波长 450nm 的酶标仪上读取各孔的 OD 值

2、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。

3、检测值范围：0-240pg/ml

操作注意事项：

1. 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。

2. 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。

3. 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。

4. 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。

5. 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。

6. 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。

7. 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。

8. 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。

9. 按照说明书中标明的时间、加液的量及顺序进行温育操作。