

## 整合素 $\alpha V \beta 3$ ELISA 方法说明书

### 试剂盒性能:

1. 灵敏度: 最小的检测浓度小于 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%。

### 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。

### 试验原理:

ES 试剂盒是固相夹心法酶联免疫吸附实验 (ELISA)。已知 ES 浓度的标准品、未知浓度的样品加入微孔酶标板内进行检测。先将 ES 和生物素标记的抗体同时温育。洗涤后, 加入亲和素标记过的 HRP。再经过温育和洗涤, 去除未结合的酶结合物, 然后加入底物 A、B, 和酶结合物同时作用。产生颜色。颜色的深浅和样品中 ES 的浓度呈比例关系。

### 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 50 $\mu$ l 于反应孔内。
3. 加入稀释好后的标准品 50 $\mu$ l 于反应孔、加入待测样品 50 $\mu$ l 于反应孔内。立即加入 50 $\mu$ l 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 80 $\mu$ l 的亲链酶素-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 50 $\mu$ l, 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 50 $\mu$ l 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。