

幽门螺旋菌抗体 elisa 方法说明书

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。

试剂盒内容及其配制:

试剂盒成份 (2-8℃保存) 96孔配置 48孔配置 配制
96/48人份酶标板 1块板(96T) 半块板(48T) 即用型
塑料膜板盖 1块 半块 即用型
标准品: 240pg/ml 1瓶(0.6ml) 1瓶(0.3ml) 按说明书进行稀释
空白对照 1瓶(1.0ml) 1瓶(0.5ml) 即用型
标准品稀释缓冲液 1瓶(5ml) 1瓶(2.5ml) 即用型
生物素标记的抗ES抗体 1瓶(6ml) 1瓶(3.0ml) 即用型
亲和链酶素-HRP 1瓶(10ml) 1瓶(5.0ml) 即用型
洗涤缓冲液 1瓶(20ml) 1瓶(10ml) 按说明书进行稀释
底物A 1瓶(6.0ml) 1瓶(3.0ml) 即用型
底物B 1瓶(6.0ml) 1瓶(3.0ml) 即用型
终止液 1瓶(6.0ml) 1瓶(3.0ml) 即用型
标本稀释液 1瓶(12ml) 1瓶(6.0ml) 即用型

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:

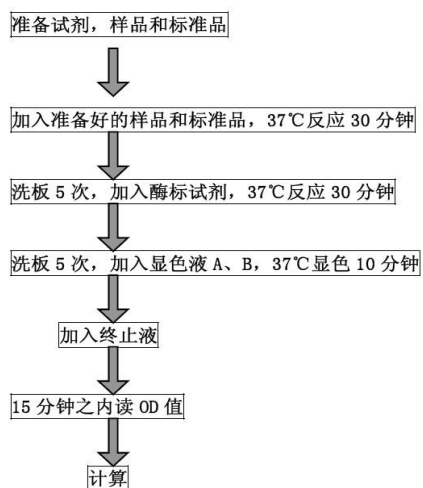
ELISA 试剂盒是固相夹心法酶联免疫吸附实验 (ELISA)。已知 TFR/CD71 浓度的标准品、未知浓度的样品加入微孔酶标板内进行检测。先将 TFR/CD71 和生物素标记的抗体同时温育。洗涤后, 加入亲和素标记过的 HRP。再经过温育和洗涤, 去除未结合的酶结合物, 然后加入底物 A、B, 和酶结合物同时作用。产生颜色。颜色的深浅和样品中 TFR/CD71 的活性浓度呈比例关系。

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 50ul 于反应孔内。
3. 加入稀释好后的标准品 50ul 于反应孔、加入待测样品 50ul 于反应孔内。立即加入 50ul 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 50u1 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。



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。稀稀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。