

III型胶原蛋白酶联免疫试剂盒说明书

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。

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:全血标本请于室温放置2小时或4℃过夜后于1000g离心20分钟,取上清即可检测,或将标本放于-20℃或-80℃保存,但应避免反复冻融。
2. 血浆:可用EDTA或肝素作为抗凝剂,标本采集后30分钟内于2-8℃1000g离心20分钟,或将标本放于-20℃或-80℃保存,但应避免反复冻融。
3. 组织匀浆:用预冷的PBS(0.01M, pH=7.4)冲洗组织,去除残留血液(匀浆中裂解的红细胞会影响测量结果),称重后将组织剪碎。将剪碎的组织与对应体积的PBS(一般按1:9的重量体积比,比如1g的组织样品对应9mL的PBS,具体体积可根据实验需要适当调整,并做好记录。推荐在PBS中加入蛋白酶抑制剂)加入玻璃匀浆器中,于冰上充分研磨。为了进一步裂解组织细胞,可以对匀浆液进行超声破碎,或反复冻融。将匀浆液于5000×g离心5~10分钟,取上清检测。
4. 细胞培养物上清或其它生物标本:1000g离心20分钟,取上清即可检测,或将标本放于-20℃或-80℃保存,但应避免反复冻融。

试剂盒组成:

- 1、30倍浓缩洗涤液 20ml×1瓶 7 终止液 6ml×1瓶
- 2、酶标试剂 6ml×1瓶 8 标准品(160pg/ml) 0.5ml×1瓶
- 3、酶标包被板 12孔×8条 9 标准品稀释液 1.5ml×1瓶
- 4、样品稀释液 6ml×1瓶 10 说明书 1份
- 5、显色剂A液 6ml×1瓶 11 封板膜 2张
- 6、显色剂B液 6ml×1/瓶 12 密封袋 1个

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%。

操作步骤:

1. 标准品的稀释:本试剂盒提供原倍标准品一支,用户可按照下列图表在小试管中进行稀释。

| | | |
|---------|-------|--------------------------------|
| 80pg/ml | 5号标准品 | 150 μl 的原倍标准品加入 150 μl 标准品稀释液 |
| 40pg/ml | 4号标准品 | 150 μl 的 5号标准品加入 150 μl 标准品稀释液 |
| 20pg/ml | 3号标准品 | 150 μl 的 4号标准品加入 150 μl 标准品稀释液 |
| 10pg/ml | 2号标准品 | 150 μl 的 3号标准品加入 150 μl 标准品稀释液 |
| 5pg/ml | 1号标准品 | 150 μl 的 2号标准品加入 150 μl 标准品稀释液 |

2. 加样：分别设空白孔（空白对照孔不加样品及酶标试剂，其余各步操作相同）、标准孔、待测样品孔。在酶标包被板上标准品准确加样 50 μl，待测样品孔中先加样品稀释液 40 μl，然后再加待测样品 10 μl（样品最终稀释度为 5 倍）。加样将样品加于酶标板孔底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀。

3. 温育：用封板膜封板后置 37℃温育 30 分钟。

4. 配液：将 30 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 30 倍稀释后备用

5. 洗涤：小心揭掉封板膜，弃去液体，甩干，每孔加满洗涤液，静置 30 秒后弃去，如此重复 5 次，拍干。

6. 加酶：每孔加入酶标试剂 50 μl，空白孔除外。

7. 温育：操作同 3。

8. 洗涤：操作同 5。

9. 显色：每孔先加入显色剂 A 50 μl，再加入显色剂 B 50 μl，轻轻震荡混匀，37℃避光显色 10 分钟。

10. 终止：每孔加终止液 50 μl，终止反应（此时蓝色立转黄色）。

11. 测定：以空白孔调零，450nm 波长依序测量各孔的吸光度（OD 值）。测定应在加终止液后 15 分钟以内进行。

计算：

以标准物的浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，在坐标纸上绘出标准曲线，根据样品的 OD 值由标准曲线查出相应的浓度；再乘以稀释倍数；或用标准物的浓度与 OD 值计算出标准曲线的直线回归方程式，将样品的 OD 值代入方程式，计算出样品浓度，再乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。

注意事项：

1. 试剂盒从冷藏环境中取出应在室温平衡 15-30 分钟后方可使用，酶标包被板开封后如未用完，板条应装入密封袋中保存。

2. 浓洗涤液可能会有结晶析出，稀释时可在水浴中加温助溶，洗涤时不影响结果。

3. 各步加样均应使用加样器，并经常校对其准确性，以避免试验误差。一次加样时间最好控制在 5 分钟内，如标本数量多，推荐使用排枪加样。

4. 请每次测定的同时做标准曲线，最好做复孔。如标本中待测物质含量过高（样本 OD 值大于标准品孔第一孔的 OD 值），请先用样品稀释液稀释一定倍数（n 倍）后再测定，计算时请最后乘以总稀释倍数（ $\times n \times 5$ ）。

5. 封板膜只限一次性使用，以避免交叉污染。

6. 底物请避光保存。

7. 严格按照说明书的操作进行，试验结果判定必须以酶标仪读数为准。

8. 所有样品，洗涤液和各种废弃物都应按传染物处理。

9. 本试剂不同批号组分不得混用。

保存条件及有效期：

1. 试剂盒保存：； 2-8℃。

2. 有效期：6 个月。