

过氧化物酶体增殖物激活受体 δ elisa 方法说明书

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S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。

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 μ l 的原倍标准品加入 150 μ l 标准品稀释液
40pg/ml	4号标准品	150 μ l 的 5号标准品加入 150 μ l 标准品稀释液
20pg/ml	3号标准品	150 μ l 的 4号标准品加入 150 μ l 标准品稀释液
10pg/ml	2号标准品	150 μ l 的 3号标准品加入 150 μ l 标准品稀释液
5pg/ml	1号标准品	150 μ l 的 2号标准品加入 150 μ l 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 μ l,待测样品孔中先加样品稀释液 40 μ l,然后再加待测样品 10 μ l(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 $^{\circ}$ C 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 μ l,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 μ l,再加入显色剂 B 50 μ l,轻轻震荡混匀,37 $^{\circ}$ C 避光显色 10 分钟。

10. 终止: 每孔加终止液 50 μ l,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。

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: 不与其他细胞因子反应。

3. 重复性: 板内、板间变异系数均小于 10%。

试剂盒组成:

1、30 倍浓缩洗涤液 20ml \times 1 瓶 7 终止液 6ml \times 1 瓶

2、酶标试剂 6ml \times 1 瓶 8 标准品(160pg/ml) 0.5ml \times 1 瓶

3、酶标包被板 12 孔 \times 8 条 9 标准品稀释液 1.5ml \times 1 瓶

4、样品稀释液 6ml \times 1 瓶 10 说明书 1 份

5、显色剂 A 液 6ml \times 1 瓶 11 封板膜 2 张

6、显色剂 B 液 6ml \times 1 瓶 12 密封袋 1 个

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°C 保存, 但应避免反复冻融
2. 不能检测含 NaN_3 的样品, 因 NaN_3 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°C 过夜后于 1000g 离心 20 分钟, 取上清即可检测, 或将标本放于 -20°C 或 -80°C 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 $2 - 8^{\circ}\text{C}$ 1000g 离心 20 分钟, 或将标本放于 -20°C 或 -80°C 保存, 但应避免反复冻融。
3. 组织匀浆: 用预冷的 PBS (0.01M , $\text{pH}=7.4$) 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 $5000\times\text{g}$ 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°C 或 -80°C 保存, 但应避免反复冻融。

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: $2-8^{\circ}\text{C}$ 冷藏。
2. 有效期: 6 个月。