

尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 5 测定试剂盒说明书

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 $5\sim 10$ 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。

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。

试剂盒组成:

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

试剂盒特点:

- 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、尿液等等多种标本类型;
- 5、节省实验经费。

保存条件及有效期:

1. 试剂盒保存: ; 2-8℃。
2. 有效期: 6 个月。

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。