

5. 辣根过氧化物酶标记亲和素稀释液（HRP-avidin Diluent） 1×10ml/瓶。
6. 生物素标记抗体（Biotin-antibody）： 1×120μl/瓶（1： 100）。
7. 辣根过氧化物酶标记亲和素（HRP-avidin）： 1×120μl/瓶（1： 100）。
8. 底物溶液（TMB Substrate）： 1×10ml/瓶。
9. 浓洗涤液（Wash Buffer）： 1×20ml/瓶，使用时每瓶用蒸馏水稀释 25 倍。
10. 终止液（Stop Solution）： 1×10ml/瓶（2N H₂SO₄）。

需要而未提供的试剂和器材

1. 标准规格酶标仪
2. 高速离心机
3. 电热恒温培养箱
4. 干净的试管和 Eppendorf 管
5. 系列可调节移液器及吸头，一次检测样品较多时，最好用多通道移液器
6. 蒸馏水，容量瓶等

标本的采集及保存

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℃ 1000 g 离心 15 分钟，或将标本放于 -20℃ 或 -80℃ 保存，但应避免反复冻融。
3. 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。

注：标本溶血会影响最后检测结果，因此溶血标本不宜进行此项检测。

标本的稀释原则：

首先通过文献检索的方式了解待测样本的大致含量，确定适当的稀释倍数。只有稀释至标准曲线的范围内，检测的结果才是准确的。稀释的过程中，应做好详细的记录。最后计算浓度时，稀释了“N”倍，标本的浓度应再乘以“N”。

标准品的稀释原则：2 瓶，每瓶临用前以样品稀释液稀释至 1ml，盖好后静置 10 分钟以上，然后反复颠倒/搓动以助溶解，其浓度为 2000 ng/ml，做系列倍比稀释后，分别稀释 2000 ng/ml，1000 ng/ml，500 ng/ml，250 ng/ml，125 ng/ml，62.5 ng/ml，31.2 ng/ml，样品稀释液直接作为标准浓度 0 ng/ml，临用前 15 分钟内配制。

如配制 1000 ng/ml 标准品：取 0.5ml（不要少于 0.5ml）2000 ng/ml 的上述标准品加入含 0.5ml 样品稀释液的 Eppendorf 管中，混匀即可，其余浓度以此类推。

生物素标记抗体的稀释原则：

临用前以生物素标记抗体稀释液稀释，稀释前根据预先计算好的每次实验所需的总量配制（每孔 100 μ l），实际配制时应多配制 0.1-0.2ml。如 10 μ l 生物素标记抗体加 990 μ l 生物素标记抗体稀释液的比例配制，轻轻混匀，在使用前一小时内配制。

辣根过氧化物酶标记亲和素的稀释原则：

临用前以辣根过氧化物酶标记亲和素稀释液稀释，稀释前根据预先计算好的每次实验所需的总量配制（每孔 100 μ l），实际配制时应多配制 0.1-0.2ml。如 10 μ l 辣根过氧化物酶标记亲和素加 990 μ l 辣根过氧化物酶标记亲和素稀释液 的比例配制，轻轻混匀，在使用前一小时内配制。

操作步骤

实验开始前，请提前配置好所有试剂，试剂或样品稀释时，均需混匀，混匀时尽量避免起泡。

每次检测都应该做标准曲线。如样品浓度过高时，用样品稀释液进行稀释，以使样品符合试剂盒的检测范围。

1. 加样：分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。空白孔加样品稀释液 100 μ l，余孔分别加标准品或待测样品 100 μ l，注意不要有气泡，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，酶标板加上盖或覆膜，37 $^{\circ}$ C 反应 120 分钟。

为保证实验结果有效性，每次实验请使用新的标准品溶液。

2. 弃去液体，甩干，不用洗涤。每孔加生物素标记抗体工作液 100 μ l（取 1 μ l 生物素标记抗体加 99 μ l 生物素标记抗体稀释液的比例配制，轻轻混匀，在使用前一小时内配制），37 $^{\circ}$ C,60

分钟。

3. 温育 60 分钟后，弃去孔内液体，甩干，洗板 3 次，每次浸泡 1-2 分钟，200 μ l/每孔，甩干。
4. 每孔加辣根过氧化物酶标记亲和素工作液（同生物素标记抗体工作液） 100 μ l，37 $^{\circ}$ C，60 分钟。
5. 温育 60 分钟后，弃去孔内液体，甩干，洗板 5 次，每次浸泡 1-2 分钟，200 μ l/每孔，甩干。
6. 依序每孔加底物溶液 90 μ l，37 $^{\circ}$ C 避光显色（30 分钟内，此时肉眼可见标准品的前 3-4 孔有明显的梯度蓝色，后 3-4 孔显色不明显，即可终止）。
7. 依序每孔加终止溶液 50 μ l，终止反应（此时蓝色立转黄色）。终止液的加入顺序应尽量与底物液的加入顺序相同。为了保证实验结果的准确性，底物反应时间到后应尽快加入终止液。
8. 用酶联仪在 450nm 波长依序测量各孔的光密度（OD 值）。在加终止液后 15 分钟以内进行检测。

实验备注

1. 用户在初次使用试剂盒时，应将各种试剂管离心数分钟，以便试剂集中到管底。
2. 每次实验留一孔作为空白调零孔，该孔不加任何试剂，只是最后加底物溶液及 2N H₂SO₄。测量时先用此孔调 OD 值至零。
3. 为防止样品蒸发，试验时将反应板放于铺有湿布的密闭盒内，酶标板加上盖或覆膜。
4. 未使用完的酶标板或者试剂，请于 2-8 $^{\circ}$ C 保存。标准品、生物素标记抗体工作液、辣根过氧化物酶标记亲和素工作液请依据所需的量配置使用。请勿重复使用已稀释过的标准品、生物素标记抗体工作液、或辣根过氧化物酶标记亲和素工作液。
5. 建议检测样品时均设双孔测定，以保证检测结果的准确性。

洗板方法

手工洗板方法：吸去（不可触及板壁）或甩掉酶标板内的液体；在实验台上铺垫几层吸水纸，酶标板朝下用力拍几次；将推荐的洗涤缓冲液至少 0.3ml 注入孔内，浸泡 1-2 分钟。根据需要，重复此过程数次。

自动洗板：如果有自动洗板机，应在熟练使用后再用到正式实验过程中。

计算

以标准物的浓度为横坐标（对数坐标），OD 值为纵坐标（普通坐标），在半对数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. 本操作说明适用于 48T 试剂盒，但 48T 试剂盒所有试剂减半。
2. 当混合蛋白溶液时应尽量轻缓，避免起泡。
3. 洗涤过程非常重要，不充分的洗涤易造成假阳性。
4. 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。
5. 请每次测定的同时做标准曲线，最好做复孔。
6. 如标本中待测物质含量过高，请先稀释后再测定，计算时请最后乘以稀释倍数。
7. 在配制标准品、检测溶液工作液时，请以相应的稀释液配制，不能混淆。
8. 底物请避光保存。
9. 不要用其它生产厂家的试剂替换试剂盒中的试剂。