优利科（上海）生命科学有限公司
YOULIKE (SHANGHAI) LIFE SCIENCE CO., LTD

大鼠转酮醇酶(TK)ELISA试剂盒说明书

试验原理：

大鼠转酮醇酶(TK)是固相夹心法酶联免疫吸附实验（ELISA）.已知待测物质浓度的标准品、未知浓度的样品加入微孔酶标板内进行检测。先将待测物质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待测物质的浓度呈比例关系。

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	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TXA2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

自备材料

1）蒸馏水。

2）加样器：5ul、10ul、50ul、100ul、200ul、500ul、1000ul。

3）振荡器及磁力搅拌器等。

安全性

1） 避免直接接触终止液和底物 A、B。一旦接触到这些液体，请尽快用水冲洗。

2） 实验中不要吃喝、抽烟或使用化妆品。

3） 不要用嘴吸取试剂盒里的任何成份。

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。

样品收集、处理及保存方法

1） 血清---操作过程中避免任何细胞刺激。使用不含热原和内毒素的试管。收集血液后，1000×g 离心 10 分钟将血清和红细胞迅速小心地分离。

2） 血浆---EDTA、柠檬酸盐、肝素血浆可用于检测。1000×g 离心 30 分钟去除颗粒。

3） 细胞上清液 -1000×g 离心 10 分钟去除颗粒和聚合物。

4） 组织匀浆---将组织加入适量生理盐水捣碎。1000×g 离心 10 分钟，取上清液

5） 保存------如果样品不立即使用，应将其分成小部分-70 ℃保存，避免反复冷冻。尽可能的不要使用溶血或高血脂血。如果血清中大量颗粒，检测前先离心或过滤。不要在 37℃或更高的温度加热解冻。应在室温下解冻并确保样品均匀地充分解冻。

试剂的准备

1） 标准品：标准品的系列稀释应在实验时准备，不能储存。稀释前将标准品振荡混匀。

2） 洗涤缓冲液（50×）的稀释：蒸馏水 50 倍稀释。

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 80ul 的亲和链酶素-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 50ul，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 50ul 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。

局限

6 号标准品以上的结果为非线性的，根据此标准曲线无法得到精确的结果。

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%。

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），相应的待测物质标准品浓度为横坐标（X），做得相应的曲线，样品的待测物质含量可根据其 OD 值由标准曲线换算出相应的浓度。