

小鼠 6 酮前列腺素（6-K-PG）酶联免疫分析试剂盒使用说明书

本试剂盒仅供研究使用

预期应用

ELISA 法定量测定小鼠血清、血浆、细胞培养物上清或其它相关液体中 6-K-PG 含量。

实验原理

本试剂盒应用双抗体夹心酶标免疫分析法测定标本中 6-K-PG 水平。用纯化的抗体包被微孔板，制成固相抗体，往包被单抗的微孔中依次加入 6-K-PG 抗原、生物素化的抗小鼠 6-K-PG 抗体、HRP 标记的亲合素，经过彻底洗涤后用底物 TMB 显色。TMB 在过氧化物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 6-K-PG 呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度（OD 值），计算样品浓度。

试剂盒组成及试剂配制

1. 酶联板：一块（96 孔）
2. 标准品（冻干品）：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 1000 pg/mL，做系列倍比稀释后，分别稀释成 1000 pg/mL，500 pg/mL，250 pg/mL，125 pg/mL，62.5 pg/mL，31.2 pg/mL，15.6 pg/mL，其原液直接作为最高标准浓度，样品稀释液直接作为标准浓度 0 pg/mL，临用前 15 分钟内配制。
如配制 500 pg/mL 标准品：取 0.5ml 1000 pg/mL 的上述标准品加入含有 0.5ml 样品稀释液的 Eppendorf 管中，混匀即可，其余浓度以此类推。
3. 样品稀释液：1×20ml/瓶。
4. 检测稀释液 A：1×10ml/瓶。
5. 检测稀释液 B：1×10ml/瓶。
6. 检测溶液 A：1×120ul/瓶（1：100）临用前以检测稀释液 A 1：100 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 100ul），实际配制时应多配制 0.1-0.2ml。如 1ul 检测溶液 A 加 99ul 检测稀释液 A 的比例配制，轻轻混匀，在使用前一小时内配制。

7. 检测溶液 B: 1×120ul/瓶 (1: 100) 临用前以检测稀释液 B1: 100 稀释。稀释方法同检测溶液 A。

8. 底物溶液: 1×10ml/瓶。

9. 浓洗涤液: 1×30ml/瓶, 使用时每瓶用蒸馏水稀释 25 倍。

10. 终止液: 1×10ml/瓶 (2N H₂SO₄)。

标本的采集及保存

1. 细胞培养物上清: 请离心后收集上清, 并将标本保存于-20℃, 且应避免反复冻融。
2. 血清: 标本请于室温放置 2 小时或 4℃过夜后于 1000 x g 离心 20 分钟, 取上清即可检测, 或将标本放于-20℃保存, 但应避免反复冻融。
3. 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° C 1000 x g 离心 15 分钟, 或将标本放于-20℃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。

操作步骤

各试剂在使用前平衡至室温。

1. 加样: 分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。除空白孔外, 余孔分别加标准溶液或待测样品 100ul, 注意不要有气泡, 轻轻混匀, 酶标板加上盖, 37℃反应 120 分钟。
2. 弃去液体, 甩干, 不用洗涤。
3. 每孔加检测溶液 A 工作液 100ul, 37℃, 60 分钟。洗板 3 次, 350ul/每孔, 甩干。
4. 每孔加检测溶液 B 工作液 100ul, 37℃, 60 分钟, 洗板 5 次, 甩干。
5. 依序每孔加底物溶液 90ul, 37℃避光显色 30 分钟 (此时肉眼可见标准品的前 3-4 孔有明显的梯度兰色, 后 3-4 孔梯度不明显)。
6. 依序每孔加终止溶液 50ul, 终止反应 (此时兰色立转黄色)。用酶联仪在 450nm 波长依序测量各孔的光密度 (OD 值)。

注:

1. 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 $2\text{NH}_2\text{SO}_4$.

测量时先用此孔调 OD 值至零。

2. 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。

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 0.4ml 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。

特异性

本试剂盒可同时检测重组或天然的小鼠 6-K-PG, 且与其它相关蛋白无交叉反应。

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. 洗涤过程非常重要, 不充分的洗涤易造成假阳性。
2. 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。
3. 请每次测定的同时做标准曲线, 最好做复孔。
4. 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。
5. 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。
6. 底物请避光保存。

检测范围:

15.6 pg/mL -1000 pg/mL

说明

1. 在储存及孵育过程中避免将试剂暴露在强光中。所有试剂瓶盖须盖紧以防止蒸发和污染，试剂避免受到微生物的污染，因为蛋白水解酶的干扰将导致出现错误的结果。
2. 小心吸取试剂并严格遵守给定的孵育时间和温度。请注意在吸取标本 / 标准品，酶结合物或底物时，第一个孔与最后一个孔加样之间的时间间隔如果太大，将会导致不同的“预孵育”时间，从而明显地影响到测量值的准确性及重复性。而且，洗涤不充分将影响试验结果。
3. 试剂盒保存：部分试剂保存于-20℃，部分试剂保存于 2-8℃，具体以标签上的标示为准。
4. 浓洗涤液会有盐析出，稀释时可在水浴中加温助溶。
5. 刚开启的酶联板孔中可能会含有少许水样物质，此为正常现象，不会对实验结果造成任何影响。
6. 中、英文说明书可能会有不一致之处，请以英文说明书为准。
7. 所有的样品都应管理好，按照规定的程序处理样品和检测装置。
8. 有效期：6 个月