

大鼠瘦素(LEP)化学发光试剂盒使用说明书

产品编号: U0084r


www.eiaab.cn

本试剂盒仅供体外研究使用!

预期应用

化学发光法定量测定大鼠血清、血浆、组织匀浆、细胞培养物上清或其它相关生物液体中瘦素(LEP)含量。

实验原理

本试剂盒应用竞争化学发光免疫分析法测定标本中 LEP 水平。用纯化的特异抗体包被微孔板,制成固相抗体,实验时往微孔中先后加入 LEP 标准品或受检标本和生物素标记 LEP,使之与固相抗体反应。如受检标本中无抗原,则生物素标记抗原能顺利地与固相抗体结合。如受检标本中含有抗原,则与生物素标记抗原以同样的机会与固相抗体结合,竞争性地占去了生物素标记抗原与固相载体结合的机会,使生物素标记抗原与固相载体的结合量减少。洗涤,依次加入 HRP 标记的亲合素、反应底物鲁米诺,在 HRP 催化下辐射出最大发射波长为 425nm 的化学发光,发光值和样品中的 LEP 含量呈反向相关。用微孔板化学发光分析仪测定发光度(RLU.S⁻¹.PW⁻¹),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 1.0ml,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 5000 pg/mL,做系列倍比稀释后,分别稀释成 2500 pg/mL, 1250 pg/mL, 625 pg/mL, 312 pg/mL, 156 pg/mL, 78 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 2500 pg/mL 标准品:取 0.50 ml (不要少于 0.50 ml) 5000 pg/mL 的上述标准品加入含有 0.50 ml 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。
4. 检测稀释液 A: 1×10ml。
5. 检测稀释液 B: 1×10ml。
6. 检测溶液 A: 1×60μl (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(50μl/孔),实际配制时应多配制 0.1-0.2ml。如 10μl 检测溶液 A 加 990μl 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: 1×120μl/瓶(1:100) 临用前以检测稀释液 B 1:100 稀释。稀释方法同检测溶液 A。
8. 浓洗涤液: 1×30 mL/瓶,使用时每瓶用蒸馏水稀释 25 倍;
9. 底物溶液 A: 1×6 mL/瓶;底物溶液 B: 1×6 mL/瓶(临用前底物液 A 和 B 等体积混合均匀为底物工作液)
10. 覆膜: 5 张
11. 使用说明书: 1 份

自备物品

1. 化学发光分析仪
2. 微量加液器及吸头，EP 管
3. 蒸馏水或去离子水，全新滤纸

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 1000 x g 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° C 1000 x 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. 其它生物标本：请 1000 x g 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：以上标本置 4℃保存应小于 1 周，-20℃或-80℃均应密封保存，-20℃不应超过 1 个月，-80℃不应超过 2 个月；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

实验开始前，各试剂均应平衡至室温（试剂不能直接在 37℃溶解）；试剂或样品稀释时，均需混匀，混匀时尽量避免起泡。实验前应预测样品含量，如样品浓度过高时，应对样品进行稀释，以使稀释后的样品符合试剂盒的检测范围，计算时再乘以相应的稀释倍数。

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 50μl，余孔分别加标准品或待测样品 50μl，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。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. 立即在每个孔中加入检测溶液 A 工作液 50μl（在使用前半小时内配制），轻轻晃动混匀，酶标板加上覆膜，37℃反应 60 分钟。
3. 弃去液体，甩干，洗板 3 次。每次浸泡 1-2 分钟，大约 400μl/每孔，甩干（也可轻拍将孔内液体拍干）。
4. 每孔加检测溶液 B 工作液 100μl，酶标板加上覆膜 37℃反应 45 分钟。
5. 温育 45 分钟后，弃去孔内液体，甩干，洗板 5 次，每次浸泡 1-2 分钟，400μl/每孔，甩干（也可轻拍将孔内液体拍干）。
6. 依序每孔加底物工作液 100 ul，轻轻摇匀避光反应 2 分钟，并放入微孔板化学发光分析仪读取吸光值（RLU.S⁻¹）；每间隔 1-2 分钟检测一次，选取信噪比最好的一组数据。

注：

1. 试剂准备：所有试剂都必须在使用前达到室温，使用后请立即按照说明书要求保存试剂。实验操作中请使用一次性的吸头，避免交叉污染。
2. 加样：加样或加试剂时，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。一次加样时间（包括标准品及所有样品）最好控制在 10 分钟内，如标本数量多，推荐使用多道移液器加样。
3. 孵育：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，以避免液体蒸发；洗板后应尽快进行下步操作，任何时候都应避免酶标板处于干燥状态；同时应严格遵守给定的孵育时间和温度。
4. 洗涤：洗涤过程中反应孔中残留的洗涤液应在滤纸上充分拍干，勿将滤纸直接放入反应孔中吸水，同时要消除板底残留的液体和手指印，避免影响最后的读数。

5. **试剂配制:** Detection A 及 Detection B 在使用前请手甩几下或少时离心处理, 以使管壁或瓶盖的液体沉积到管底。标准品、检测溶液 A 工作液、检测溶液 B 工作液请依据所需的量配置使用, 并使用相应的稀释液配制, 不能混淆。请精确配置标准品及工作液, 尽量不要微量配置 (如吸取检测溶液 A 时, 一次不要小于 10 μ l), 以避免由于不准确稀释而造成的浓度误差; 请勿重复使用已稀释过的标准品、检测溶液 A 工作液或检测溶液 B 工作液。
6. **底物:** 底物请避光保存, 在储存和温育时避免强光直接照射。
建议检测样品时均设双孔测定, 以保证检测结果的准确性。
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. 每次实验留一孔作为空白调零孔, 该孔不加任何试剂, 只是最后加底物工作液。测量时先用此孔调 (RLU.S⁻¹) 值至零;

洗板方法

1. 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。
2. 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大鼠 LEP, 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), (RLU.S⁻¹) 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 (RLU.S⁻¹) 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 (RLU.S⁻¹) 值计算出标准曲线的直线回归方程式, 将样品的 (RLU.S⁻¹) 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。

检测范围: 78 pg/mL - 5000 pg/mL

说明

1. 只有全部使用 USCNLIFE™ 试剂才能保证检测效果, 因为所有试剂都是有关联的, 不能混用其他制造商的产品。只有严格遵守 USCNLIFE™ 试剂的试验说明才会得到最佳的检测结果。
2. 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。
3. 试剂盒保存: 请收到试剂盒后尽快将酶标板、标准品、检测溶液 A 和检测溶液 B 保存于 -20℃, 底物保存于 4℃, 其余试剂短期保存请置于 4℃, 长期保存则置于 -20℃。
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. 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。
7. 有效期: 6 个月。
8. 本操作说明适用于 48T 试剂盒, 但 48T 试剂盒所有试剂减半。