

鸡催乳素(PRL)酶联免疫分析

试剂盒使用说明书

产品编号: E0846Ch



www.eiaab.cn

本试剂盒仅供体外研究使用、不用于临床诊断!

预期应用

ELISA 法定量测定鸡血清、血浆或其它相关液体中催乳素(PRL)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催乳素(PRL)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催乳素(PRL)抗原、生物素化的抗鸡催乳素(PRL)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催乳素(PRL)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)

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 50 ng/ml, 做系列倍比稀释后, 分别稀释 25 ng/ml, 12.5 ng/ml, 6.25 ng/ml, 3.12 ng/ml, 1.56 ng/ml, 0.78 ng/ml, 0.39 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 25 ng/ml 标准品: 取 0.5ml 50 ng/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。

2. 样品稀释液: 1×20ml/瓶。

3. 检测稀释液 A: 1×10ml/瓶。

4. 检测稀释液 B: 1×10ml/瓶。

5. 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。

6. 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。

7. 底物溶液: 1×10ml/瓶。

8. 浓洗涤液: 1×30ml/瓶, 使用时每瓶用蒸馏水稀释 25 倍。

9. 终止液: 1×10ml/瓶(2N H₂SO₄)。

标本的采集及保存

1. 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。

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 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

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 100ul，余孔分别加**标准品**或待测样品 100ul，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℃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**检测溶液 A 工作液** 100ul（取 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），37℃，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，350ul/每孔，甩干。
4. 每孔加**检测溶液 B 工作液（同检测 A 工作液）** 100ul，37℃，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，350ul/每孔，甩干。
6. 依序每孔加**底物溶液** 90ul，37℃**避光显色**（30 分钟内，此时肉眼可见标准品的前 3-4 孔有明显的梯度兰色，后 3-4 孔梯度不明显，即可终止）。
7. 依序每孔加**终止溶液** 50ul，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。

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 2NH₂SO₄。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，酶标板加上盖或覆膜。
3. 未使用完的酶标板或者试剂，请于 2-8℃保存。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。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。
4. 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。

特异性

本试剂盒可同时检测重组或天然的鸡催乳素(PRL)，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：

0.39 ng/ml -50 ng/ml

说明

1. 试剂盒保存：-20℃（较长时间不用时）；2-8℃（频繁使用时）。
2. 有效期：6 个月
3. 浓洗涤液会有盐析出，稀释时可在水浴中加温助溶。
4. 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。
5. 中、英文说明书可能会有不一致之处，请以英文说明书为准。