

总前列腺特异抗原 ELISA 试剂盒说明书

试验原理:

ES 试剂盒是固相夹心法酶联免疫吸附实验 (ELISA) . 已知 ES 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 ES 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 ES 的浓度呈比例关系。

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。稀释比例按下表中进行:

240 pg/ml	(6号标准品)	原倍浓度不用稀释直接加入 50ul。
120 pg/ml	(5号标准品)	100ul 的原倍标准品加入 100ul 的标准品稀释液
60 pg/ml	(4号标准品)	100ul 的 5号标准品加入 100ul 的标准品稀释液
30 pg/ml	(3号标准品)	100ul 的 4号标准品加入 100ul 的标准品稀释液
15 pg/ml	(2号标准品)	100ul 的 3号标准品加入 100ul 的标准品稀释液
7.5 pg/ml	(1号标准品)	100ul 的 2号标准品加入 100ul 的标准品稀释液
0 pg/ml	(空白对照)	原始浓度不用稀释直接加入 50ul。

2. 洗涤缓冲液 (50×) 的稀释: 蒸馏水 50 倍稀释。

标本要求:

1. 标本采集后尽早进行提取, 提取按相关文献进行, 提取后应尽快进行实验。若不能马上进行试验, 可将标本放于-20℃保存, 但应避免反复冻融
2. 不能检测含 NaN₃ 的样品, 因 NaN₃ 抑制辣根过氧化物酶的 (HRP) 活性。

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 的亲合链酶素-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。

4、敏感度: 0.1 pg/ml

结果判断与分析:

- 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 ES 标准品浓度为横坐标 (X), 做得相应的曲线, 样品的 ES 含量可根据其 OD 值由标准曲线换算出相应的浓度。
- 3、检测值范围: 0-240pg/ml

操作注意事项:

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。

保存条件及有效期

1. 试剂盒保存：2-8℃。
2. 有效期：6 个月