

转谷氨酰胺酶 2C 多肽定量试剂盒说明书

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: 不与其他细胞因子反应。
3. 重复性: 板内、板间变异系数均小于 10%。

特点:

- 一、高效、灵敏、特异的抗体;
- 二、稳定的重复性和可靠性;
- 三、吸附性能好, 空白值低, 孔底透明度高的固相载体;
- 四、适用血清、血浆、组织匀浆液、细胞培养上清液、尿液等多种标本类型;

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°C 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°C 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°C 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。稀释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。

ELISA 可用于测定抗原, 也可用于测定抗体。ELISA 实验中有三种必要的试剂:

- ① 固相的抗原或抗体（用于结合到固相载体上）
- ② 标记的抗原或抗体（标记物）
- ③ 作用的底物（显色剂，用于显色）

四种常见 ELISA 方法

1. 直接 ELISA

将抗原固定于 ELISA 板上，然后用酶标抗体直检测抗原。

相较于其它类型的 ELISA 实验，直接 ELISA 实验步骤少，检测速度快，不需要用到二抗，避免了交叉反应，测定结果不容易出错。但是由于直接 ELISA 的抗原不是特异性固定的，样本中的靶蛋白及其他杂质蛋白都会与 ELISA 板结合，实验背景会比较高。而且直接 ELISA 每种靶蛋白都需要准备能够与其特异性结合的一抗，实验不太灵活。另外由于没有使用二抗，信号没有被放大，降低了测定的灵敏度。

2. 间接 ELISA

先将抗原结合到 ELISA 板上，随后分两步进行检测：首先加入检测抗体与抗原特异性结合，随后加入酶标二抗检测并利用底物显色。

与直接 ELISA 相比，间接 ELISA 用到酶标二抗，具有更高的灵敏度，也需要更少的标记抗体，更经济。间接 ELISA 还提供了更大的灵活性，因为不同的一抗能够与单一标记的二抗一同使用。间接 ELISA 实验的缺点是存在交叉反应的可能性（酶标二抗直接与抗原结合），可能会增加背景，同时与直接 ELISA 相比，间接 ELISA 实验多了二抗孵育的步骤，实验周期延长。

3. 夹心 ELISA

先将捕获抗体固定于 ELISA 板孔中，然后加入样品，接着加入检测抗体。如果检测抗体是酶标抗体，则可称为直接夹心 ELISA；如果检测抗体不带有标记，则还需要使用酶标二抗与检测抗体结合，这种称为间接夹心 ELISA。

夹心 ELISA 的灵敏度高，它比直接或间接 ELISA 敏感 2-5 倍；同时夹心 ELISA 使用两种特异性抗体与抗原结合，拥有很高的特异性。另外夹心 ELISA 能够通过直接或间接的方式进行检测，灵活性较高。夹心 ELISA 的缺点是对配对抗体要求很高，如果没有标准化的试剂盒或者已经通过测试的配对抗体，则需要对配对抗体定制并进行优化，因为降低捕获抗体与检测抗体之间的交叉反应是非常重要的。

4. 竞争 ELISA 法

预先将抗原包被在固相载体上，并加入酶标记的特异性抗体。实验时，加入待检抗原（或抗体），如果待检物是抗原，则待检抗原与预先包被在固相载体上的抗原竞争结合酶标抗体；如果待检测物是抗体，则待检抗体就与系统中原有的酶标抗体竞争结合包被在固相载体上的抗原。通过洗涤洗掉被竞争结合的酶标抗体，最后加底物显色。需要注意的是显色结果与待检抗原（或抗体）的量成反比。

竞争 ELISA 相对以上介绍的三种方法更复杂一些，但以上三种 ELISA 类型都适用于竞争 ELISA 的形式。其主要优点在于可检测不纯的样品，且数据再现性高，但存在整体敏感性和专一性较差的问题。

ELISA 常见问题与解决方法

1. 阴性对照出现阳性结果

- ① 样品、试剂被污染，或加样时操作不当导致相邻孔之间溶液溅洒出现交叉污染——更换试剂，小心操作。
- ② 酶标板洗涤不彻底——洗板前先将抗体溶液倒干净，然后清洗液倒满板孔，确保能充分洗涤。
- ③ 抗体量过多导致非特异性结合——根据说明书的推荐量使用抗体，稀释抗体到适当浓度。

2. 酶标板整体背景高

- ① 抗体非特异性结合——应确保板孔进行了封闭并且使用的是恰当的封闭液以防止非特异性结合。
- ② 底物结合浓度过高——对底物进行适当稀释。
- ③ 反应时间过长——当酶标板显色足够进行吸光度读数时立即使用终止液终止反应，适当缩短显色时间。
- ④ 底物溶液污染——正常底物溶液应是澄清透明的，若出现黄色或其他颜色表明受到污染，应更换新的底物溶液。
- ⑤ 底物孵育过程没有避光——底物孵育应在避光条件下进行。

3. 复孔之间重复性差

- ① 样品数量不整齐，加样时间有长有短——加重复孔时尽量保持加样时间与第一次接近。
- ② 加样量不一致——样品稀释前应充分混匀，并且使用同一移液枪。
- ③ 洗涤条件、操作人员不一致——重复测定样品时，操作条件、人员应尽可能与上次保持一致。

4. 吸光值偏高或偏低

- ① 样品中待测抗原含量太低会导致测定结果偏低——可尝试增加样品使用量。
- ② 加入抗体量不合适会造成结果偏低或偏高——使用建议抗体量或为了使结果更好尽可能调整抗体的最适用量。

- ③ 孵育时间太短导致检测结果偏低——适当延长抗体或抗原的孵育时间，确保待测样品与检测抗体能充分结合。
- ④ 孵育温度不适合——应保证抗体在最适宜条件下进行孵育（一般 37℃ 孵育 1h）。