

人 MDA 试剂盒

试验原理:

人 MDA 试剂盒是固相夹心法酶联免疫吸附实验 (ELISA). 已知待测物质浓度的标准品、未知浓度的样品加入微孔酶标板内进行检测。先将待测物质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待测物质的浓度呈比例关系。

内容及其配制

| 试剂盒成份 (2-8℃保存) | 96 孔配置 | 48 孔配置 | 配制 |
|-----------------|-------------|-------------|----------|
| 96/48 人份酶标板 | 1 块板 (96T) | 半块板 (48T) | 即用型 |
| 塑料膜板盖 | 1 块 | 半块 | 即用型 |
| 标准品 | 1 瓶 (0.6ml) | 1 瓶 (0.3ml) | 按说明书进行稀释 |
| 空白对照 | 1 瓶 (1.0ml) | 1 瓶 (0.5ml) | 即用型 |
| 标准品稀释缓冲液 | 1 瓶 (5ml) | 1 瓶 (2.5ml) | 即用型 |
| 生物素标记的抗 TXA2 抗体 | 1 瓶 (6ml) | 1 瓶 (3.0ml) | 即用型 |
| 亲和链酶素-HRP | 1 瓶 (10ml) | 1 瓶 (5.0ml) | 即用型 |
| 洗涤缓冲液 | 1 瓶 (20ml) | 1 瓶 (10ml) | 按说明书进行稀释 |
| 底物 A | 1 瓶 (6.0ml) | 1 瓶 (3.0ml) | 即用型 |
| 底物 B | 1 瓶 (6.0ml) | 1 瓶 (3.0ml) | 即用型 |
| 终止液 | 1 瓶 (6.0ml) | 1 瓶 (3.0ml) | 即用型 |
| 标本稀释液 | 1 瓶 (12ml) | 1 瓶 (6.0ml) | 即用型 |

自备材料

- 1) 蒸馏水。
- 2) 加样器: 5ul、10ul、50ul、100ul、200ul、500ul、1000ul。
- 3) 振荡器及磁力搅拌器等。

安全性

- 1) 避免直接接触终止液和底物 A、B。一旦接触到这些液体, 请尽快用水冲洗。
- 2) 实验中不要吃喝、抽烟或使用化妆品。
- 3) 不要用嘴吸取试剂盒里的任何成份。

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。

样品收集、处理及保存方法

- 1) 血清----操作过程中避免任何细胞刺激。使用不含热原和内毒素的试管。收集血液后, $1000 \times g$ 离心 10 分钟将血清和红细胞迅速小心地分离。
- 2) 血浆----EDTA、柠檬酸盐、肝素血浆可用于检测。 $1000 \times g$ 离心 30 分钟去除颗粒。
- 3) 细胞上清液--- $1000 \times g$ 离心 10 分钟去除颗粒和聚合物。
- 4) 组织匀浆----将组织加入适量生理盐水捣碎。 $1000 \times g$ 离心 10 分钟, 取上清液
- 5) 保存-----如果样品不立即使用, 应将其分成小部分- 70°C 保存, 避免反复冷冻。尽可能的不要使用溶血或高脂血。如果血清中大量颗粒, 检测前先离心或过滤。不要在 37°C 或更高的温度加热解冻。应在室温下解冻并确保样品均匀地充分解冻。

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。
- 2) 洗涤缓冲液 ($50 \times$) 的稀释: 蒸馏水 50 倍稀释。

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°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。

局限

6 号标准品以上的结果为非线性的, 根据此标准曲线无法得到精确的结果。

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

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)，相应的待测物质标准品浓度为横坐标 (X)，做得相应的曲线，样品的待测物质含量可根据其 OD 值由标准曲线换算出相应的浓度。