

小鼠髓过氧化物酶(MPO) 酶联免疫分析

试剂盒使用说明书

第一部分 ELISA 简介

ELISA 是酶联接免疫吸附剂测定 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 的简称。自上世纪 70 年代初问世 以来, 发展十分迅速, 目前已被广泛用于生物学和医学科学的许多领域。

ELISA 的基础是抗原或抗体的固相化及抗原或抗体的酶标记。结合在固相载体表面的抗原或抗体仍保持其免疫学活性, 酶标记的抗原或抗体既保留其免疫学活性, 又保留酶的活性。在测定时, 受检标本 (测定其中的抗体或抗原) 与固相载体表面的抗原或抗体起反应。用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与液体中的其他物质分开。再加入酶标记的抗原或抗体, 也通过反应而结合在固相载体上。此时固相上的酶量与标本中受检物质的量呈一定的比例。加入酶反应的底物后, 底物被酶催化成为有色产物, 产物的量与标本中受检物质的量直接相关, 故可根据呈色的深浅进行定性或定量分析。由于酶的催化效率很高, 间接地放大了免疫反应的结果, 使测定方法达到很高的敏感度。

第二部分 ELISA 的样本实验准备

在收集样本前都必须有一个完整的计划, 必须清楚要检测的成份是否足够稳定。对收集后当天就进行检测的样本, 及时储存在 4℃ 备用。对于隔天再检测的样本, 及时分装后冻存在 -20℃ 备用, 有条件的, 最好 -70℃ 冻存备用。标本应避免反复冻融。

液体类标本: 包括血清、血浆、尿液、胸腹水、脑脊液、细胞培养上清等。

1. 血清: 室温血液自然凝固 10-20 分钟, 离心 20 分钟左右 (2000-3000 转/分)。仔细收集上清, 保存过程中如出现沉淀, 应再次离心。
2. 血浆: 应根据标本的要求选择 EDTA、柠檬酸钠或肝素作为抗凝剂, 混合 10-20 分钟后, 离心 20 分钟左右 (2000-3000 转/分)。仔细收集上清, 保存过程中如有沉淀形成, 应该再次离心。
3. 尿液: 用无菌管收集, 离心 20 分钟左右 (2000-3000 转/分)。仔细收集上清, 保存过程中如有沉淀形成, 应再次离心。胸腹水、脑脊液参照此实行。
4. 细胞培养上清: 检测分泌性的成份时, 用无菌管收集。离心 20 分钟左右 (2000-3000 转/分)。仔细收集上清。
5. 培养细胞: 检测细胞内的成份时, 用 PBS (PH7.2-7.4) 稀释细胞悬液, 细胞浓度达到 100 万/ml 左右。通过反复冻融或加入组织蛋白萃取试剂, 以使细胞破坏并放出细胞内成份。离心 20 分钟左右 (2000-3000 转/分)。仔细收集上清。保存过程中如有沉淀形成, 应再次离心。
6. 组织标本: 切割标本后, 称取重量。加入一定量的 PBS, PH7.4。用液氮迅速冷冻保存备用。标本融化后仍然保持 2-8℃ 的温度。加入一定量的 PBS (PH7.4), 或组织蛋白萃取试剂, 用手工或匀浆器将标本匀浆化。离心 20 分钟左右 (2000-3000 转/分)。仔细收集上清。分装后一份待检测, 其余冷冻备用。
7. 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。

8. 不能检测含 NaN₃ 的样品，因 NaN₃ 抑制辣根过氧化物酶的（HRP）活性。

第三部分 ELISA 试剂盒的检测目的和实验原理

1. 检测目的

本试剂盒用于测定小鼠血清、血浆及相关液体样本中髓过氧化物酶(MPO) 含量。

2. 实验原理

本试剂盒应用双抗体夹心法测定标本中小鼠髓过氧化物酶(MPO) 水平。用纯化的小鼠髓过氧化物酶(MPO) 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髓过氧化物酶(MPO) ，再与 HRP 标记的髓过氧化物酶(MPO) 抗 体结合，形成抗体-抗原-酶标抗体复合物，经过彻底洗涤后加底物 TMB 显色。TMB 在 HRP 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髓过氧化物酶(MPO) 呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度（OD 值），通过标准曲线计算样品中小鼠髓过氧化物酶(MPO) 浓度。

第四部分 试剂盒组成

试剂盒组成	48T	96T	保存
说明书	1 份	1 份	
封板膜	2 片（48）	2 片（96）	
密封袋	1 个	1 个	
酶标包被板	1×48	1×96	2-8℃保存
标准品（80ng/L）	0.5ml×1 瓶	0.5ml×1 瓶	2-8℃保存
标准品稀释液	1.5ml×1 瓶	1.5ml×1 瓶	2-8℃保存
酶标试剂	3 ml×1 瓶	6 ml×1 瓶	2-8℃保存
样品稀释液	3 ml×1 瓶	6 ml×1 瓶	2-8℃保存
显色剂 A 液	3 ml×1 瓶	6 ml×1 瓶	2-8℃保存
显色剂 B 液	3 ml×1 瓶	6 ml×1 瓶	2-8℃保存
终止液	3ml×1 瓶	6ml×1 瓶	2-8℃保存
浓缩洗涤液	(20 倍)20ml×1 瓶	(30 倍)20ml×1 瓶	2-8℃保存

第五部分 操作步骤

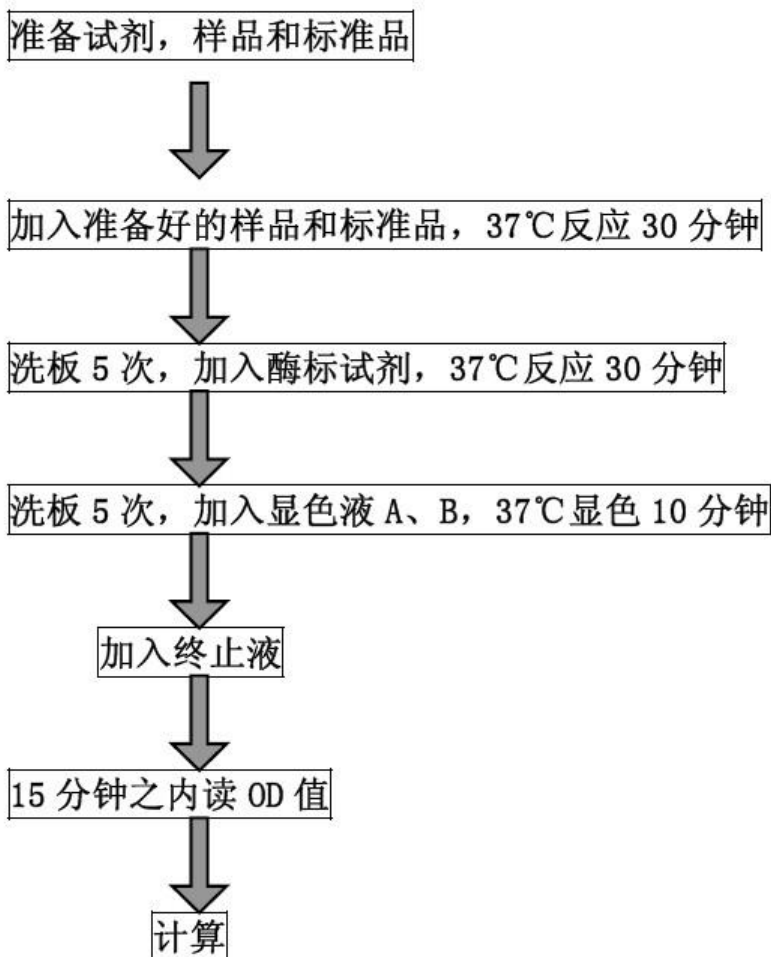
1. 标准品的稀释：本试剂盒提供原倍标准品一支，用户可按照下列图表在小试管中进行稀释。

40ng/L	5 号标准品	150μl 的原倍标准品加入 150μl 标准品稀释液
20ng/L	4 号标准品	150μl 的 5 号标准品加入 150μl 标准品稀释液
10ng/L	3 号标准品	150μl 的 4 号标准品加入 150μl 标准品稀释液
5ng/L	2 号标准品	150μl 的 3 号标准品加入 150μl 标准品稀释液
2.5ng/L	1 号标准品	150μl 的 2 号标准品加入 150μl 标准品稀释液

2. 加样：分别设空白孔（空白对照孔不加样品及酶标试剂，其余各步操作相同）、标准孔、待测样品孔。在酶标包被板上标准品准确加样 50μl，待测样品孔中先加样品稀释液 40μl，

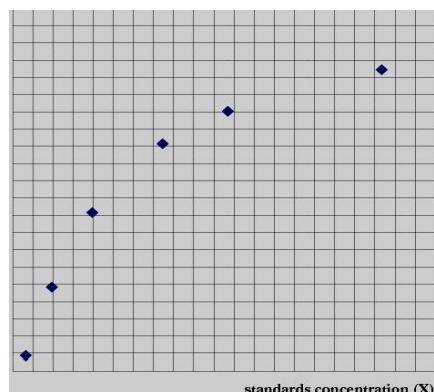
然后再加待测样品 10 μ l（样品最终稀释度为 5 倍）。加样将样品加于酶标板孔底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀。

3. 温育：用封板膜封板后置 37℃温育 30 分钟。
4. 配液：将 30 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 30 倍稀释后备用
5. 洗涤：小心揭掉封板膜，弃去液体，甩干，每孔加满洗涤液，静置 30 秒后弃去，如此重复 5 次，拍干。
6. 加酶：每孔加入酶标试剂 50 μ l，空白孔除外。
7. 温育：操作同 3。
8. 洗涤：操作同 5。
9. 显色：每孔先加入显色剂 A50 μ l，再加入显色剂 B50 μ l，轻轻震荡混匀，37℃避光显色 10 分钟。
10. 终止：每孔加终止液 50 μ l，终止反应（此时蓝色立转黄色）。
11. 测定：以空白孔调零，450nm 波长依序测量各孔的吸光度（OD 值）。测定应在加终止液后 15 分钟以内进行。
12. 操作程序总结：



第六部分 计算

以标准物的浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，在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。



(此图仅供参考)

第七部分 注意事项

1. 试剂盒从冷藏环境中取出应在室温平衡 15-30 分钟后方可使用，酶标包被板开封后如未用完，板条应装入密封袋中保存。
2. 浓洗涤液可能会有结晶析出，稀释时可在水浴中加温助溶，洗涤时不影响结果。
3. 各步加样均应使用加样器，并经常校对其准确性，以避免试验误差。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。
4. 请每次测定的同时做标准曲线，最好做复孔。如标本中待测物质含量过高（样本 OD 值大于标准品孔第一孔的 OD 值），请先用样品稀释液稀释一定倍数（ n 倍）后再测定，计算时请最后乘以总稀释倍数（ $\times n \times 5$ ）。
5. 封板膜只限一次性使用，以避免交叉污染。
6. 底物请避光保存。
7. 严格按照说明书的操作进行，试验结果判定必须以酶标仪读数为准。
8. 所有样品，洗涤液和各种废弃物都应按传染物处理。
9. 本试剂不同批号组分不得混用。

第八部分 检测范围

1ng/L - 40ng/L

第九部分 保存条件及有效期

1. 试剂盒保存: 2-8℃
2. 有效期: 6 个月