

大鼠糖胺聚糖(GAG)ELISA

试剂盒使用说明书

产品编号: E1850r


www.eiaab.cn

本试剂盒仅供体外研究使用!

预期应用

ELISA 法定量测定大鼠血清、血浆、组织匀浆、细胞培养物上清或其它相关液体中 GAG 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 GAG 水平。用纯化的抗体包被微孔板,制成固相抗体,往包被有固相抗体的微孔中依次加入 GAG 抗原、生物素化的抗 GAG 抗体、HRP 标记的亲和素,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 GAG 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)
2. **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 100 ng/mL, 做系列倍比稀释后, 分别稀释成 100 ng/mL, 50 ng/mL, 25 ng/mL, 12.5 ng/mL, 6.25 ng/mL, 3.12 ng/mL, 1.56 ng/mL, 其原液直接作为最高标准浓度, 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 50 ng/mL 标准品: 取 0.5ml 100 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。
3. **样品稀释液**: 1×20ml/瓶。
4. **检测稀释液 A**: 1×10ml/瓶。
5. **检测稀释液 B**: 1×10ml/瓶。
6. **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。
7. **检测溶液 B**: 1×120ul/瓶 (1: 100) 临用前以**检测稀释液 B** 1: 100 稀释。稀释方法同检测溶液 A。
8. **底物溶液**: 1×10ml/瓶。
9. **浓洗涤液**: 1×30ml/瓶, 使用时每瓶用蒸馏水稀释 25 倍。
10. **终止液**: 1×10ml/瓶 (2N H₂SO₄)。

标本的采集及保存

1. 细胞培养物上清: 请离心后收集上清, 并将标本保存于 -20℃, 且应避免反复冻融。
2. 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。

3. 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° C 1000 x g 离心 15 分钟，或将标本放于 -20° C 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。

4. 组织匀浆：将动物的组织标本先用 PBS 洗涤，去除多余血液，匀浆化后放在 20ml PBS 中于 -20° C 放置过夜，第二天，经过二次反复冻融破膜，将匀浆物 5000x g 离心 5 分钟，取上清即可检测。

操作步骤

各试剂在使用前平衡至室温。

1. 加样：分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。除空白孔外，余孔分别加**标准溶液**或待测样品 100ul，注意不要有气泡，轻轻混匀，酶标板加上盖，37° C 反应 120 分钟。
2. 弃去液体，甩干，不用洗涤。
3. 每孔加**检测溶液 A 工作液** 100ul，37° C，60 分钟。洗板 3 次，350ul/每孔，甩干。
4. 每孔加**检测溶液 B 工作液** 100ul，37° C，60 分钟，洗板 5 次，甩干。
5. 依序每孔加**底物溶液** 90ul，37° C 避光显色 30 分钟（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）。
6. 依序每孔加**终止溶液** 50ul，终止反应（此时兰色立转黄色）。用酶联仪在 450nm 波长依序测量各孔的光密度（OD 值）。

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。

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 0.4ml 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大鼠 GAG，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：

1.56 ng/mL -100 ng/mL

说明

1. 试剂盒保存：-20° C（较长时间不用时）；2-8° C（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。