

大鼠铁调素 Hepcidin 酶联免疫分析 (ELISA)

试剂盒使用说明书

本试剂盒仅供研究使用。

药品名称:

通用名: 大鼠铁调素 Hepcidin 酶联免疫分析试剂盒

使用目的:

本试剂盒用于测定大鼠血清, 血浆及相关液体样本中铁调素 Hepcidin 含量。

实验原理

本试剂盒应用双抗体夹心法测定标本中大鼠铁调素 Hepcidin 水平。用纯化的大鼠 Hepcidin 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 Hepcidin, 再与 HRP 标记的 Hepcidin 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 Hepcidin 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大鼠铁调素 Hepcidin 浓度。

试剂盒组成

1	20 倍浓缩洗涤液	30ml×1 瓶	7	终止液	6ml×1 瓶
2	酶标试剂	6ml×1 瓶	8	标准品 (135μg/L)	0.5ml×1 瓶
3	酶标包被板	12 孔×8 条	9	标准品稀释液	1.5ml×1 瓶
4	样品稀释液	6ml×1 瓶	10	说明书	1 份
5	显色剂 A 液	6ml×1 瓶	11	封板膜	2 张
6	显色剂 B 液	6ml×1/瓶	12	密封袋	1 个

标本要求

1. 不能检测含 NaN₃ 的样品, 因 NaN₃ 抑制辣根过氧化物酶的 (HRP) 活性。
2. 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

操作步骤

1. 标准品的稀释与加样: 在酶标包被板上设标准品孔 10 孔, 在第一、第二孔中分别加标准品 100μl, 然后在第一、第二孔中加标准品稀释液 50μl, 混匀; 然后从第一孔、第二孔中各取 100μl 分别加到第三孔和第四孔, 再在第三、第四孔分别加标准品稀释液 50μl, 混匀; 然后在第三孔和第四孔中先各取 50μl 弃掉, 再各取 50μl 分别加到第五、第六孔中, 再在第五、第六孔中分别加标准品稀释液 50ul, 混匀; 混匀后从第五、第六孔中各取 50μl 分别加到第七、第八孔中, 再在第七、第八孔中分别加标准品稀释液 50μl, 混匀后从第七、第八孔中分别取 50μl 加到第九、第十孔中, 再在第九第十孔分别加标准品稀释液 50μl, 混匀后从第九第十孔中各取 50μl 弃掉。(稀释后各孔加样量都为 50μl, 浓度分别为 90μg/L, 60μg/L, 30μg/L, 15μg/L, 7.5μg/L)。
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)、待测样品孔。在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液 40μl, 然后再加待测样品 10μl (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 20 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 20 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 50μl，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 A50μl，再加入显色剂 B50μl，轻轻震荡混匀，37℃避光显色 15 分钟。
10. 终止：每孔加终止液 50μl，终止反应（此时蓝色立转黄色）。
11. 测定：以空白空调零，450nm 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。

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。

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污染物处理。
9. 本试剂不同批号组分不得混用。
10. 如与英文说明书有异，以英文说明书为准。

检测范围：

5μg/L -100μg/L

规格：

96 人份/盒

保存条件及有效期

1. 试剂盒保存：2-8℃。
2. 有效期：6 个月