mlbio 梅联生物
Good elisakit producers

兔Ⅱ型胶原(ColⅡ)ELISA试剂盒说明书

试验原理：

兔Ⅱ型胶原(ColⅡ)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。

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。稀稀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×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×g 离心 30 分钟去除颗粒。

3□ 细胞上清液 -1000×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×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 ℃保存，避免反复冷冻。尽可能的不要使用溶血或高血脂血。如果血清中大量颗粒，检测前先离心或过滤。不要在 37℃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×）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℃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 的亲和链酶素-HRP，轻轻振荡混匀，37℃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℃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。

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：不与其它细胞因子反应。

3 重复性：板内、板间变异系数均小于 10%。

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。