

## 犬 NADPH 氧化酶(NADPH-OX)ELISA 试剂盒说明书

### 试验原理:

犬 NADPH 氧化酶(NADPH-OX)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。

### 试剂盒内容及其配制

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， $1000\times g$  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。

## 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 的亲合链酶素-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：不与其他细胞因子反应。
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。