

小鼠 2,3-二磷酸甘油酸(2,3-DPG)ELISA 试剂盒

(用于血清、血浆、组织匀浆、细胞培养上清液和其它生物体内)

原理

本实验采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法。用抗小鼠 2,3-DPG 单抗包被于酶标板上,标准品和样品中的 2,3-DPG 与单抗结合,加入生物素化的抗小鼠 2,3-DPG,形成免疫复合物连接在板上,辣根过氧化物酶标记的 Streptavidin 与生物素结合,加入底物工作液显蓝色,最后加终止液硫酸,在 450nm 处测 OD 值,2,3-DPG 浓度与 OD 值成正比,可通过绘制标准曲线求出标本中 2,3-DPG 浓度。

试剂盒组成 (2-8℃保存)

| | | | |
|---------------------------------|------|----------------------------|------|
| 酶标板 (Coated Wells) | 96孔 | 酶标抗体工作液 (Enzyme Conjugate) | 12ml |
| 10×标本稀释液 (Sample Buffer) | 12ml | 20×浓缩洗涤液 (Wash Buffer) | 50ml |
| 标准品 (Standards): 120mmol/L | 1瓶 | 底物工作液 (TMB Solution) | 12ml |
| 第一抗体工作液 (Biotinylated Antibody) | 6ml | 终止液 (Stop Solution) | 12ml |

准备试剂与收集血样

- 10×标本稀释液用蒸馏水作 1:10 倍稀释 (示例: 1ml 浓稀释液+9ml 蒸馏水)。
- 收集标本: 血清、血浆 (EDTA、柠檬酸盐、肝素抗凝)、细胞培养上清液、组织匀浆等尽早检测, 2-8℃保存 48 小时; 更长时间须冷冻 (-20℃或-70℃) 保存, 避免反复冻融。
- 标准品液配制: 设标准管 7 管, 每管加入标本稀释液 100ul。在第一管中加入 120mmol/L 的标准品溶液 100ul 混匀后用加样器吸出 100ul, 移至第二管。如此反复作对倍稀释, 从第六管中吸出 100ul 弃去。第七管为空白对照。加上原液管总共八管。
- 洗涤液: 用重蒸水 1:20 稀释 (示例: 1ml 浓缩洗涤液加入 19ml 的重蒸水)

检测程序

- 加样: 每孔各加入标准品或待测样品 5ul。将反应板振荡 60 秒
- 每孔加入第一抗体工作液 45ul(空白除外), 盖紧封板膜以避免交叉污染。将反应板置振荡器 (400-500rpm) 室温 (18-25℃) 120 分钟。
- 洗板: 用洗涤液将反应板充分洗涤 4-6 次, 向滤纸上印干。
- 每孔加酶标抗体工作液 100ul。将反应板置 37℃ 10 分钟。
- 洗板: 同前。
- 每孔加入底物工作液 100ul, 置 37℃ 暗处反应 15 分钟。
- 每孔加入 100ul 终止液混匀。
- 30 分钟内用酶标仪在 450nm 处测吸光值。

结果计算与判断

- 所有 OD 值建议减除空白值后再行计算。如空白 OD 低于 0.1, 也可以直接计算。
- 以标准品 120、60、30、15、7.5、3.75、1.875、0 mmol/L 为横坐标, OD 值为纵坐标, 使用软件作图, 画出标准曲线。
- 根据样品 OD 值计算出相应 2,3-DPG 含量。软件可以向本公司邮件索取。

试剂盒性能

- 灵敏度: 最小的 2,3-DPG 检测浓度小于 1mmol/L。
- 特异性: 可同时检测重组或天然的小鼠 2,3-DPG。不与小鼠其它细胞因子有交叉反应。
- 重复性: 板内、板间变异系数均小于 10%。

注意事项

- 以上标准孔及待测样品均建议做复孔, 每次测定应同时做标准曲线。
- 洗涤过程很关键。洗涤不充分将导致精确度误差及 OD 值错误地升高。
- 检测时所有试剂都要恢复到室温。板条开封后剩余板条要再封好, 保持板条干燥。
- 试剂盒使用超敏 TMB 溶液, 若显色过深会出现絮状物, 属正常现象, 不影响结果判读。
- 说明书中试剂盒组成为 96T 的量, 48T 的量应减半!
- 本试剂盒宜置 4℃ 冰箱保存。仅用于科研, 不能用于临床诊断!