大鼠血栓调节蛋白(TM)ELISA 试剂盒

货 号:	PY0412Ra-T	**检测范围:**	3.125ng/mL-100ng/mL
种 属:	大鼠	**保存温度:**	2-8℃
规 格:	96T/48T	**有 效 期:**	6个月
用 途:	用于体外定量检测细胞、血清、血浆以及其他样本中的大鼠TM。		

※ 实验原理

本试剂盒采用双抗体夹心法 ELISA 技术：将捕获抗体包被于酶标板上，捕获样品及标准品中的待测物 TM，洗涤后，再加入生物素标记的检测抗体进行孵育后清洗，形成“捕获抗体-抗原-检测抗体”免疫复合物，随后加入链霉亲和素偶联的辣根过氧化物酶进行孵育，待孵育结束后清洗，过程中游离的成分均被洗去，接着加入 TMB 显色后，若样本中有待测物则显蓝色，加入终止液停止反应。用酶标仪在 450nm 处测 OD 值，颜色的深浅和样品中的待测物的含量呈正比，通过绘制标准曲线计算出样本中 TM 的浓度。

※ 试剂盒组成

中文名称	96T 配置	48T 配置	保存条件
预包被酶标板	96 孔	48 孔	2-8℃
标准品(冻干粉)	2 支	1 支	
标准品复溶液	2 支	1 支	
标准品&样本稀释液	25mL × 1 瓶	25mL × 1 瓶	
生物素抗体	10mL × 1 瓶	10mL × 1 瓶	
HRP 标记亲和素	10mL × 1 瓶	10mL × 1 瓶	
TMB 显色液	10mL × 1 瓶	10mL × 1 瓶	
终止液	6mL × 1 瓶	6mL × 1 瓶	
20×浓缩洗涤液	25mL × 1 瓶	25mL × 1 瓶	
封板膜	4 张	4 张	RT
产品说明书	1 份	1 份	

需要而未提供的物品：

仪器设备	其它
含 450nm 检测波长的酶标仪	吸水纸或者抽纸
各种量程移液器	蒸馏水或去离子水
可提供 37°C 环境的恒温箱或培养箱	各种规格吸头和 EP 管

※ **注意事项**

1. **本试剂盒仅供教研使用，不可作为体外诊断依据；**
2. 预包被酶标板拆封后，未使用的板条请装入自封袋密封。为降低不同时间检测板内变异系数，间隔 48 小时内检测可 2- 8°C保存，如果间隔时间较长，请-20°C保存，并在下次检测时重新绘制标准曲线；
3. 试剂盒提供的底物显色液使用前应保持无色或很浅颜色，直到添加到板中。如果收到的显色液显示很深蓝色，请联系售后技术支持；
4. **此试剂盒提供的终止液为稀硫酸溶液，具有一定腐蚀性，应谨慎操作。如果不小心沾到皮肤上，请立即擦去，并用清水冲洗；**
5. **请严格按照说明书进行操作；如有疑问，请一定与技术工程师确认后再进行操作，避免样本和时间上的浪费；**
6. 不同批号试剂不建议混用，请勿使用其他品牌来源的试剂；
7. 封板膜、吸水纸、加样过程中所用的 EP 管和吸头为一次性使用，严禁混用。

※ **样本处理及要求：**

1、**血清：**将收集于血清分离管的全血标本在室温静置 30min 以上，不超过 2 小时，然后 2-8°C，2500-3500×g 离心 20min，仔细收集上清；

2、**血浆：**应根据标本的要求选择 EDTA 或柠檬酸钠作为抗凝剂，样品采集后 30min 内在 2-8°C，3000×g 离心 15min，仔细收集上清。保存过程中如有沉淀形成，应再次离心；

3、**尿液：**用无菌管收集，2-8°C，2500-3500×g 离心 10min，仔细收集上清。保存过程中如有沉淀形成，应再次离心。胸腹水、脑脊液参照实行；

4、**细胞培养上清：**收集液体后于 2-8°C，2500-3500×g 离心 20min，除去杂质及细胞碎片，取上清检测。

5、**细胞裂解液：**贴壁细胞用预冷的 PBS(0.01M,pH=7.4)轻轻清洗，然后用胰蛋白酶消化，2-8℃，1000×g 离心 5min 后收集细胞；悬浮细胞可直接离心收集。收集的细胞用冷的 PBS 洗涤 3 次。每 1×10^6 个细胞中加入 150-200μL PBS 重悬，并通过反复冻融或超声使细胞破碎(推荐在 PBS 中加入蛋白酶抑制剂；若含量很低可减少 PBS 的体积)。将提取液于 2-8℃，10000×g 离心 10min，取上清检测；

6、**组织样本：**用预冷的 PBS(0.01M,pH=7.4)冲洗组织，去除残留血液，称重后将组织剪碎。将剪碎的组织与对应体积的 PBS(一般按 1:9 的重量体积比，比如 1 g 的组织样品对应 9 mL 的 PBS，具体体积可根据实验需要适当调整，并做好记录。推荐在 PBS 中加入蛋白酶抑制剂)加入匀浆器中，在冰上充分研磨。为了进一步裂解组织细胞，可以对匀浆液进行反复冻融或超声破碎。最后将匀浆液于 2- 8℃，10000×g 离心 5-10min，取上清检测；

7、**其它生物标本：**2- 8℃，2500-3500×g 离心 20min，仔细收集上清。

样品外观：样品应清澈透明，悬浮物应离心去除。

样品保存：样品收集后尽快检测。若不能及时检测，请按一次使用量分装，冻存于-20℃(1 个月内检测)，或-80℃(6 个月内检测)，避免反复冻融。

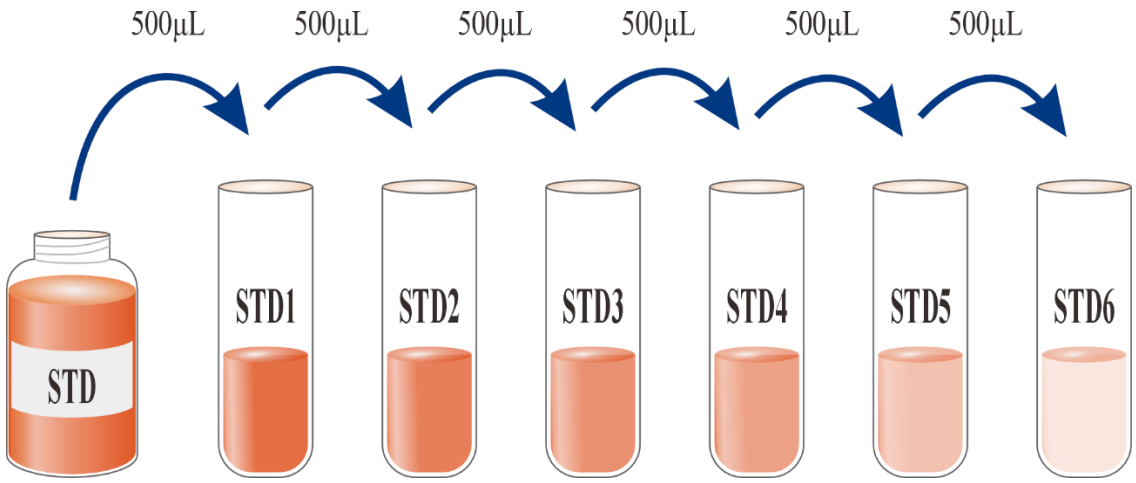
※ **试剂准备**

使用前将所有试剂置于室温或 37℃温箱平衡 30 分钟左右。

洗涤液配制：如果洗涤液（20×）有晶体析出，需在 37℃下加热至晶体全部溶解。用蒸馏水 1:20 稀释（例如：1mL 浓缩洗涤液加入 19mL 的蒸馏水）。

标准品重溶：用标准品复溶液重溶标准品，将一瓶标准品复溶液全部加入到一瓶标准品冻干粉中，上下颠倒数次混匀（不可剧烈震荡产生大量气泡），然后静止 10 分钟左右，重溶后得到品母液 STD，浓度为 200ng/mL。

标准品倍比稀释：准备 6 个试管，随后在 6 个试管中分别加入 500μL 的 1×标准品稀释液，在这 6 个单独的试管中将重溶后标准品母液 STD1 依次 2 倍倍比稀释，共得到 6 个浓度的标准品，依次为：100ng/mL、50ng/mL、25ng/mL、12.5ng/mL、6.25ng/mL、3.125ng/mL。具体稀释方法如图所示。**以样本稀释液作为空白对照孔**(0ng/mL)。



稀释后各管中标准品浓度如下(单位：ng/mL)

STD	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6
200	100	50	25	12.5	6.25	3.125

备注：如待测样本中 TM 浓度高于标准品最高值，请根据实际情况对样品进行适当稀释。

※ **实验步骤**

所有标准品、样品建议复孔检测

1. **酶标板准备：**确定实验所需要的孔数，取下其它不使用的板条放入密封袋；
2. **样本孵育：**首先在所有孔加入 50μL 样本稀释液，然后在标准孔分别加入 50μL 不同浓度的标准品，空白孔再加 50μL 样本稀释液，样本孔加入 50μL 待测样品，盖上封板膜，37°C反应 1 h。孵育结束后，每孔加入 200μL 1×洗涤缓冲液，轻轻晃动 30 秒，甩干，以这种方式清洗 3 次后拍干；
3. **抗体孵育：**每孔加入 100μL 生物素化抗体，盖上封板膜，37°C反应 1h。孵育结束后，重复步骤 2 中的清洗方式清洗 3 次后拍干；
4. **酶标试剂孵育：**每孔加入 100μL HRP 标记亲和素，盖上封板膜，37°C避光反应 30min，重复步骤 2 中的清洗方式清洗 4 次，**在新的吸水纸上拍干**；
5. **底物显色：**每孔加入 100μL 底物显色液 TMB，盖上封板膜，37°C避光反应 15 分钟。注意观察显色过程，如果加入显色液后 STD1 孔颜色较深，待 STD6 孔出现轻微蓝色时即可提前终止显色；
6. **终止反应：**待显色反应结束后，每孔加入 50μL 终止液，轻轻晃动酶标板混匀，10 分钟内用酶标仪在 450nm 处测吸光值。

※ **结果的计算**

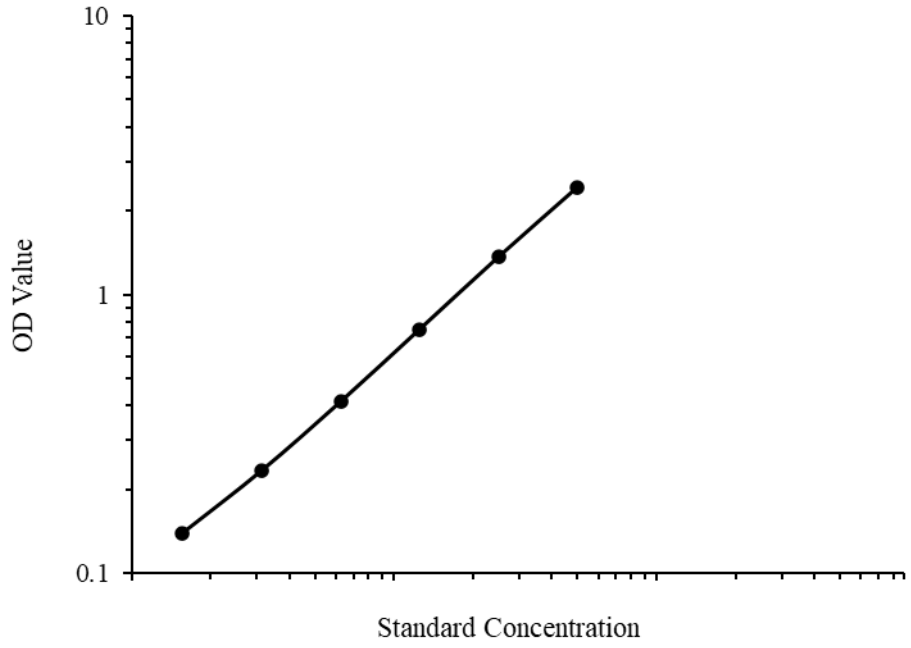
计算标准品和样本复孔的平均 OD 值并减去空白孔的 OD 值作为校正值。以浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，在坐标纸上绘出四参数逻辑函数的标准曲线(作图时去掉空白组的值)。或者使用能够生成四参数逻辑（4-P）曲线拟合的计算机软件来创建标准曲线。

若样品 OD 值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测并在计算样本浓度时乘以相应的稀释倍数。

※ **示例数据**

以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验数据建立标准曲线。

标准品浓度 (ng/mL)	100	50	25	12.5	6.25	3.125	0
OD 值	2.707	1.533	0.795	0.42	0.229	0.133	0.04
校正 OD 值	2.667	1.493	0.755	0.38	0.189	0.093	0



本图所示标准曲线仅供示例，结果计算应以同次试验标准品所绘标准曲线为准计算样本结果。

精密度

板内，板间变异系数均<10%。

板内精密度：在同一块板上重复检测三个已知浓度的样品 20 次，计算浓度的变异系数（CV）。

板间精密度：在三块板子上对三个已知浓度的样品分别进行 20 次重复检测，计算浓度的变异系数（CV）。

	板内精密度			板间精密度		
样本	1	2	3	1	2	3
数量	20	20	20	20	20	20
平均值(ng/mL)	5.7	11.64	24.74	6.21	12.01	24.08
标准差	0.1	0.26	0.85	0.14	0.37	0.84
变异系数(%)	1.81	2.24	3.42	2.22	3.12	3.49

回收率

分别往不同样本中添加已知浓度的大鼠 TM，做回收实验，得出回收率范围和平均回收率。

样本类型	范围（%）	平均回收率（%）
血清(n=8)	88-100	96
血浆(n=8)	95-105	96
细胞培养物(n=8)	99-115	104

灵敏度

经样本测试，本试剂盒的检测灵敏度为 0.78ng/mL。

线性关系

将高浓度大鼠TM加入样本中，在标准曲线范围内分别稀释2倍，4倍，8倍，16倍做回收实验，得出回收率及平均回收率。

		血清（n=4）	细胞培养物(n=4)
1：2	回收率范围（%）	95-113	94-106
	平均回收率（%）	99	97
1：4	回收率范围（%）	100-114	98-114
	平均回收率（%）	101	106
1：8	回收率范围（%）	101-118	101-116
	平均回收率（%）	108	113
1：16	回收率范围（%）	109-121	105-122
	平均回收率（%）	111	117

特异性

该试剂盒测定可识别重组大鼠 TM。

其他相关蛋白在稀释缓冲液中制备为 50ng/mL，并测定交叉反应性。没有观察到明显的交叉反应。