本试剂盒只能用于科学研究，不得用于医学诊断

羟脯氨酸(HYP)ELISA科研试剂盒

使用说明书

货号：WL052249

检测原理

试剂盒采用竞争法酶联免疫吸附试验（ELISA）。往预先包被羟脯氨酸(HYP)抗体的包被微孔中，依次加入标本、标准品、HRP标记的竞争抗原，经过温育并彻底洗涤。用底物TMB显色，TMB在过氧化物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羟脯氨酸(HYP)呈负相关。用酶标仪在450nm 波长下测定吸光度（OD 值），计算样品浓度。

样品收集、处理及保存方法

液体样本

1、血清：用无菌管收集，室温血液自然凝固120分钟或2-8℃下过夜，在2-8℃条件下离心20分钟（3000转/分），小心仔细收集上清即可检测，或存储在-20℃或-80℃备用。但应避免反复冻融。

2、血浆：应根据标本的要求选择EDTA或肝素钠作为抗凝剂，混合均匀后30分钟内，2-8℃条件离心20分钟（3000转/分），小心仔细收集上清即可检测，或存储在-20℃或-80℃备用。但应避免反复冻融。

3、尿液、胸腹水、脑脊液、唾液：用无菌管收集，2-8℃条件离心20分钟（3000转/分）。小心仔细收集上清，或存储在-20℃或-80℃备用。但应避免反复冻融。

4、细胞培养上清：用无菌管收集，2-8℃条件离心20分钟（3000转/分），小心仔细收集上清，或存储在-20℃或-80℃备用。但应避免反复冻融。

固体样本

1、动物组织样本：用预冷的 PBS (0.01M, pH=7.4)冲洗组织，去除残留血液，称重后将组织剪碎成小块。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 1g 的组织样品对应 9mL 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)加入玻璃匀浆器中，在冰上（低温下）充分研磨。或者在组织研磨仪中进行研磨，如果需要进一步裂解组织细胞，可以对匀浆液进行超声破碎，最后将匀浆液 2-8℃条件下 5000×g 离心 10 分钟，取上清进行检测。对于植物组织或其他组织样本，在玻璃匀浆器或组织研磨仪中匀浆不彻底的话，应在液氮中进行充分研磨。

2、细胞样本：

A、动物细胞：对于贴壁细胞，用适量预冷的 PBS 轻轻清洗细胞，并用胰蛋白酶消化分离细胞。以 1000×g 离心 5 分钟收集细胞（悬浮细胞可直接离心收集）。弃上清，用冷 PBS 清洗细胞 3 次。在浓度为 1×10^7 个细胞/mL 的冷 PBS 中重新悬浮细胞。用超声破碎仪充分破碎细胞，以使细胞破坏并放出细胞内成份。2-8℃条件离心 20 分钟（3000 转/分），随后小心仔细取上清液进行检测。

B、植物细胞：用 pH7.2-7.4 的 PBS 稀释细胞悬液，使细胞浓度达到 100 万/ml 左右，置于冰盒上，用超声破碎仪，充分破碎细胞。2-8℃条件离心 20 分钟（3000 转/分），小心仔细收集上清进行检测。

3、咽拭子：加入 2ml 的 pH7.2-7.4 左右的 PBS，溶解咽拭子头部，摇匀，用镊子取出咽拭子并挤干液体，2-8℃条件离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分），仔细收集上清。分装一份待检测，其余冷冻备用，保存过程中如有沉淀形成，上样检测前应再次离心。

样本的要求

标本采集后尽早进行提取，提取后应尽快进行实验。若不能马上进行试验，样品在 2-8℃

可保存时应在6天内使用，否则必须在-20℃(≤1个月)或-80℃(≤2个月)保存，应避免反复冻融。保存过程中如有沉淀形成，上样检测前应再次离心。不能检测含NaN3的样品，因NaN3抑制辣根过氧化物酶的（HRP）活性。

自备物品

1. 酶标仪（450nm）
2. 高精度加样器及枪头：0.5-10μL、2-20μL、20-200μL、200-1000μL
3. 37℃恒温箱

操作注意事项

1. 试剂盒保存在2-8℃，使用前室温平衡20分钟。从冰箱取出的浓缩洗涤液会有结晶，这属于正常现象，水浴加热使结晶完全溶解后再使用。
2. 实验中不用的板条应立即放回自封袋中，密封（低温干燥）保存。
3. 浓度为0的S0号标准品即可视为阴性对照或者空白；按照说明书操作时样本已经稀释5倍，最终结果乘以5才是样本实际浓度。
4. 严格按照说明书中标明的时间、加液量及顺序进行温育操作。
5. 所有液体组分使用前充分摇匀。
6. 暂时用不到的酶标板条取下来放进铝箔袋备用，2-8℃保存。建议尽快使用。

试剂盒组成

名称	96孔配置	48孔配置	备注
微孔酶标板	8孔×12条	8孔×6条	无
标准品	0.3mL*6管	0.3mL*6管	无
样本稀释液	6mL	3mL	无
竞争抗原-HRP	6mL	3mL	无
20×洗涤缓冲液	25mL	15mL	按说明书进行稀释
底物	12mL	6mL	无
终止液	6mL	3mL	无
封板膜	2张	2张	无

说明书	1 份	1 份	无

注：标准品（S0-S5）浓度依次为：0、5、10、20、40、80 ng/mL

试剂的准备

20×洗涤缓冲液的稀释：蒸馏水按 1：20 稀释，即 1 份的 20×洗涤缓冲液加 19 份的蒸馏水。

洗板方法

1. 手工洗板：甩尽孔内液体，每孔加满洗涤液，静置 1min 后甩尽孔内液体，在吸水纸上拍干，如此洗板 5 次。

2. 自动洗板机：每孔注入洗液 350μL，浸泡 1min，洗板 5 次。

操作步骤

1. 从室温平衡 20min 后的铝箔袋中取出所需板条,剩余板条用自封袋密封放回 4℃。

2. 设置标准品孔和样本孔，标准品孔各加不同浓度的标准品 50μL；

3. 样本孔先加待测样本 10μL，再加样本稀释液 40μL；空白孔不加。

4. 除空白孔外，标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的竞争抗原 50μL，用封板膜封住反应孔，37℃水浴锅或恒温箱温育 60min。

5. 弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液，静置 1min，甩去洗涤液，吸水纸上拍干，如此重复洗板 5 次（也可用洗板机洗板）。

6. 每孔加入底物 100μL，37℃避光孵育 15min。

7. 每孔加入终止液 50μL，15min 内，在 450nm 波长处测定各孔的 OD 值。

结果判断

1. 15分钟内在波长450nm的酶标仪上读取各孔的OD值；

2. 百分结合率计算：设S0管计数为B0，各标准管或样品管计数为B，非特异管计数为NSB，则百分结合率计算公式如下：B/B0=(B－NSB)/(B0－NSB)×100%

3. logit计算:各标准点或样品管的logit值计算公式如下:logit=ln(B/B0)/(1－B/B0)

4. 将标准品的OD均值与标准品0点的OD均相除，为标准点的百分结合率，在log-logit坐标纸上绘图。

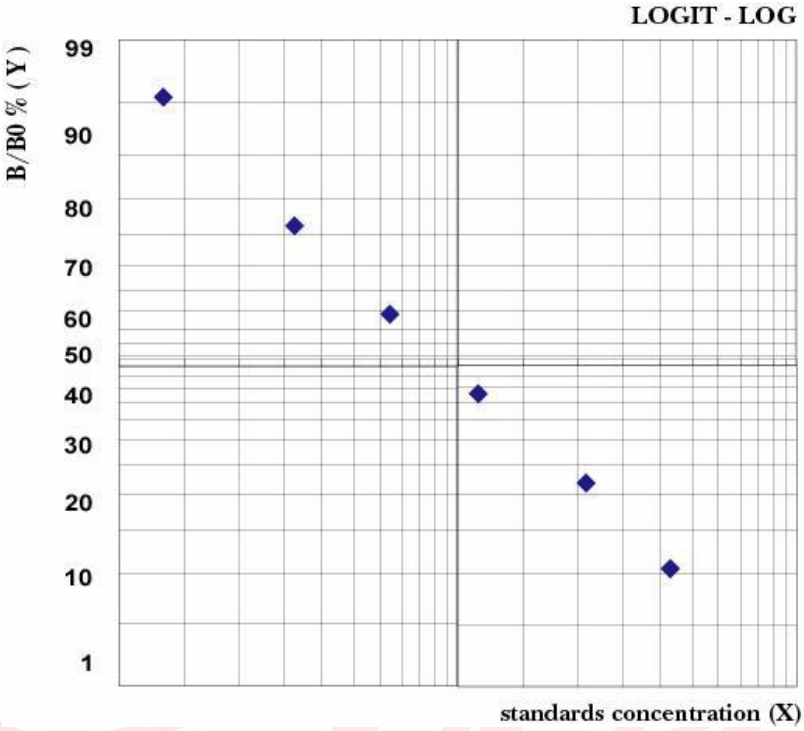
5. Log-logit双对数标准曲线：坐标纸上横轴从左至右第一个1-9表示为第一个10进位，第二个1-9表示为第二个10进位。第三个1-9表示为第三个10进位。坐标纸纵轴为百分比（1-99），即各标准吸光值的百分结合率。取一条通过各点的直线。要求尽可能多的点在线上，同时剩余的点均匀分布在直线的两边。样品也同样由吸光值计算百分结合率，再从纵轴上的相应结合率找到直线上的点，此点对应的横坐标浓度即为样品的浓度，无须换算。

6. 人工处理：以标准浓度取log值为横坐标，对应的logit值为纵坐标在普通坐标纸上或以标准浓度为横坐标，对应的B/B0为纵坐标在logit-log坐标纸上画出标准曲线（理想化时是一条直线）。根据待测样品的B/B0可以从坐标纸上查出样品的浓度值。如果使用普通坐标纸，查出的数值应取反对数才是最后的浓度值。

7. 自动处理：使用logit-log或四参数数据处理模式，由电脑自动计算得出结果。

8. 敏感度：0.1 ng/mL

9. 图例



试剂盒性能

1. 准确性：标准品线性回归与预期浓度相关系数 R 值，大于等于 0.9900。
2. 检测范围：5-80ng/mL。
3. 灵敏度：最低检测浓度小于 0.1ng/mL。
4. 特异性：不与其它可溶性结构类似物交叉反应。
5. 重复性：板内、板间变异系数均小于 15%。
6. 贮藏：2-8℃，避光防潮保存。
7. 有效期：6 个月

免责声明

1. 试剂盒仅供研究使用，不得用于临床实验或人体实验，否则所产生的一切后果，由实验者承担，本公司概不负责。
2. 严格按照说明书操作，实验者违反说明书操作，后果由实验者承担。
3.