大鼠 I 型胶原 N 末端前肽（PINP）ELISA 试剂盒

本试剂盒仅供科研使用

1、查看 ELISA 实验常见问题请登录：http://www.yfxbio.com/article.asp?m_id=122

2、参考翼飞雪 ELISA 试剂盒引用文献请登录：http://www.yfxbio.com/article.asp?m_id=138

试剂盒编号： YFXER00901

试剂盒适用： 大鼠血液、组织、细胞上清、体液等标本中 I 型胶原 N 末端前肽（PINP）的含量。

一、试剂盒组成

试剂盒成分	96 孔	48 孔	储存温度
说明书	1 份	1 份	
封板膜	2 片（48）	2 片（96）	
密封袋	1 个	1 个	
微孔酶标板	12 孔×8 条	12 孔×4 条	2-8℃
标准品	0.3mL*6 管	0.3mL*6 管	2-8℃
注：标准品（S0-S5）浓度依次为：0ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、40ng/mL、80ng/mL。			
样本稀释液	6mL	3mL	2-8℃
检测抗体-HRP	10mL	5mL	2-8℃
20×洗涤缓冲液	25mL	15mL	2-8℃
注：20×洗涤缓冲液使用前用蒸馏水按 1：20 的比例稀释，即 1 份的 20×洗涤缓冲液加 19 份的蒸馏水。			
底物 A	6mL	3mL	2-8℃
底物 B	6mL	3mL	2-8℃
终止液	6mL	3mL	2-8℃

二、实验原理

本试剂盒采用双抗体一步夹心法测定标本中 I 型胶原 N 末端前肽（PINP）的水平。向预先包被 I 型胶原 N 末端前肽（PINP）抗体的包被微孔中，依次加入标本、标准品、HRP 标记的检测抗体，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 I 型胶原 N 末端前肽（PINP）呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度（OD 值），计算样品浓度。

三、自备试剂耗材

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

四、样本处理要求

1、血清：室温血液自然凝固 10-20 分钟，离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分）。仔细收集上清，保存过程中如出现沉淀，应再次离心。

2、血浆：应根据标本的要求选择 EDTA 或柠檬酸钠作为抗凝剂，混合 10-20 分钟后，离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分）。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，离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分）。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：检测分泌性的成份时，用无菌管收集，离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分）。仔细收集上清。检测细胞内的成份时，用 PBS（PH7.2-7.4）稀释细胞悬液，细胞浓度达到 100 万/mL 左右。通过反复冻融，以使细胞破坏并放出细胞内成份。离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分）。仔细收集上清。保存过程中如有沉淀形成，应再次离心。

5、组织标本：切割标本后，称取重量。加入一定量的 PBS，PH7.4（建议组织重量与 PBS 体积比例为 1:9，即 1g 组织，加入 9mL PBS）。用液氮迅速冷冻保存备用。标本融化后仍然保持 2-8℃的温度。加入一定量的 PBS（PH7.4），用手工或匀浆器充分匀浆标本。离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分）。收集上清，分装后一份待检测，其余冷冻备用。

6、标本采集后尽早进行提取，提取按相关文献进行，提取后应尽快进行实验。若不能马上进行试验，可将标本放于-20℃保存，但应避免反复冻融。

7、不能检测含 NaN3 的样品，因 NaN3 抑制辣根过氧化物酶的（HRP）活性。

五、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。

六、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）标记的检测抗体 100μL，用封板膜封住反应孔，37℃水浴锅或恒温箱温育 60min。

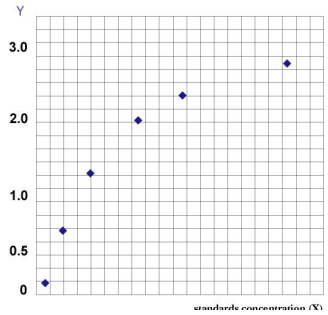
5、弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液，静置 1min，甩去洗涤液，吸水纸上拍干，如此重复洗板 5 次（也可用洗板机洗板）。

6、每孔加入底物 A、B 各 50μL，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。

七、结果判断

绘制标准曲线：在 Excel 工作表中，以标准品浓度作横坐标，对应 OD 值作纵坐标，绘制出标准品线性回归曲线，按曲线方程计算各样本浓度值。



八、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≥ 0.9900。
2、灵敏度：最低检测浓度小于 1.0ng/mL。
3、特异性：不与其它可溶性结构类似物交叉反应。
4、重复性：板内、板间变异系数均小于 15%。
5、贮藏：2-8℃，避光防潮保存。
6、有效期：6 个月。

九、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。

十、免责说明

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。