

人凝血酶原前体蛋白(PIVKA-II)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: YFXEH00945

试剂盒适用: 人血液、组织、细胞上清、体液等标本中凝血酶原前体蛋白(PIVKA-II)的含量。

一、试剂盒组成

试剂盒成分	48 孔	96 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	
酶标包被板	1x 48	1x 96	2-8°C
标准品: 360pg/mL	0.5mL x 1 瓶	0.5mL x 1 瓶	2-8°C
标准品稀释液	1.5mL x 1 瓶	1.5mL x 1 瓶	2-8°C
酶标试剂	3mL x 1 瓶	6mL x 1 瓶	2-8°C
样品稀释液	3mL x 1 瓶	6mL x 1 瓶	2-8°C
显色剂 A 液	3mL x 1 瓶	6mL x 1 瓶	2-8°C
显色剂 B 液	3mL x 1 瓶	6mL x 1 瓶	2-8°C
终止液	3mL x 1 瓶	6mL x 1 瓶	2-8°C
浓缩洗涤液	(20mL x20 倍) x 1 瓶	(20mL x30 倍) x 1 瓶	2-8°C

二、实验原理

本试剂盒采用双抗体夹心法测定标本中凝血酶原前体蛋白(PIVKA-II)的水平。用纯化的人凝血酶原前体蛋白(PIVKA-II)抗体包被微孔板,制成固相抗体,向包被单抗的微孔中依次加入人凝血酶原前体蛋白(PIVKA-II),再与 HRP 标记的凝血酶原前体蛋白(PIVKA-II)抗体结合,形成抗体-抗原-酶标抗体复合物,经过彻底洗涤后加入 TMB 显色。TMB 在 HRP 酶的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下最终转化成黄色。颜色的深浅和样品中凝血酶原前体蛋白(PIVKA-II)的含量成正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度 (OD 值),通过标准曲线计算样品中凝血酶原前体蛋白(PIVKA-II)的浓度。

三、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,应该再次离心。
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. 细胞培养上清: 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。用液氮迅速冷冻保存备用。标本融化后仍然保持 2-8°C 的温度。加入一定量的 PBS (PH7.4), 用手工或匀浆器将标本匀浆充分。离心 20 分钟左右 (2000-3000 转/分)。仔细收集上清。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°C 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。

四、操作步骤

1. 标准品的稀释与加样:在酶标包被板上设标准品孔 10 孔,在第一、第二孔中分别加标准品 100 μ L,然后在第一、第二孔中加标准品稀释液 50 μ L,混匀;然后从第一孔、第二孔中各取 100 μ L 分别加到第三孔和第四孔,再在第三、第四孔分别加标准品稀释液 50 μ L,混匀;然后在第三孔和第四孔中先各取 50 μ L 弃掉,再各取 50 μ L 分别加到第五、第六孔中,再在第五、第六孔中分别加标准品稀释液 50 μ L,混匀;混匀后从第五、第六孔中各取 50 μ L 分别加到第七、第八孔中,再在第七、第八孔中分别加标准品稀释液 50 μ L,混匀后从第七、第八孔中分别取 50 μ L 加到第九、第十孔中,再在第九第十孔分别加标准品稀释液 50 μ L,混匀后从第九第十孔中各取 50 μ L 弃掉。(稀释后各孔加样量都为 50 μ L,浓度分别为 240pg/mL, 160pg/mL, 80pg/mL, 40pg/mL, 20pg/mL)。
2. 加样:分别设空白孔 (空白对照孔不加样品及酶标试剂,其余各步操作相同)、待测样品孔。在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液 40 μ L,然后再加待测样品 10 μ L (样品最终稀释度为 5 倍)。将样品加于酶标板孔底部,尽量不触及孔壁,轻轻晃动混匀。
3. 温育:用封板膜封板后置 37°C 温育 30 分钟。
4. 配液:将 30 (48T 的 20 倍) 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 30 (48T 的 20 倍) 倍稀释后备用。
5. 洗涤:小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液,静置 30 秒后弃去,如此重复 5 次,拍干。
6. 加酶:每孔加入酶标试剂 50 μ L,空白孔除外。
7. 温育:操作同 3。
8. 洗涤:操作同 5。
9. 显色:每孔先加入显色剂 A 50 μ L,再加入显色剂 B 50 μ L,轻轻震荡混匀,37°C 避光显色 15 分钟。
10. 终止:每孔加终止液 50 μ L,终止反应 (此时蓝色立转黄色)。
11. 测定:以空白孔调零,450nm 波长依序测量各孔的吸光度 (OD 值)。测定应在加终止液后 15 分钟以内进行。

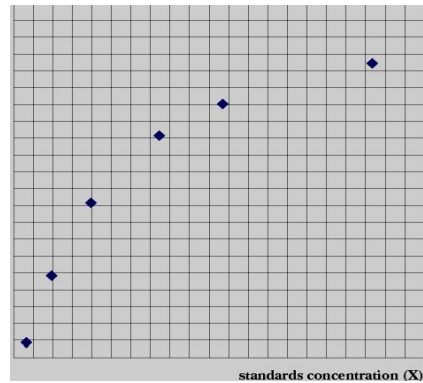
五、注意事项

1. 试剂盒从冷藏环境中取出应在室温平衡 15-30 分钟后方可使用,酶标包被板开封后如未用完,板条应装入密封袋中保存。
2. 浓洗涤液可能会有结晶析出,稀释时可在水浴中加温助溶,洗涤时不影响结果。
3. 各步加样均应使用加样器,并经常校对其准确性,以避免试验误差。一次加样时间最好控制在 5 分钟内,如标本数量多,推荐使用排枪加样。

4. 请每次测定的同时做标准曲线, 最好做复孔。如标本中待测物质含量过高 (样本 OD 值大于标准品孔第一孔的 OD 值), 请先用样品稀释液稀释一定倍数 (n 倍) 后再测定, 计算时请最后乘以总稀释倍数 ($\times n \times 5$)。
5. 封板膜只限一次性使用, 以避免交叉污染。
6. 底物请避光保存。
7. 严格按照说明书的操作进行, 试验结果判定必须以酶标仪读数为准。
8. 所有样品, 洗涤液和各种废弃物都应按传染物处理。
9. 本试剂不同批号组分不得混用。

六、计算

以标准物的浓度为横坐标, OD 值为纵坐标, 在坐标纸上绘出标准曲线, 根据样品的 OD 值由标准曲线查出相应的浓度; 再乘以稀释倍数; 或用标准物的浓度与 OD 值计算出标准曲线的直线回归方程式, 将样品的 OD 值代入方程式, 计算出样品浓度, 再乘以稀释倍数, 即为样品的实际浓度。



(此图仅供参考)

七、试剂盒性能

1. 样品线性回归与预期浓度相关系数 R 值为 0.990 以上。
2. 批内与批间应分别小于 9% 和 11%

八、检测范围

10pg/mL -300pg/mL

九、保存条件及有效期

1. 试剂盒保存: 2-8°C。
2. 有效期: 6 个月