

土壤蛋白酶（Pro）酶联免疫分析(ELISA)

试剂盒使用说明书

本试剂仅供科研使用，不得用于医学诊断

实验目的：

本试剂盒用于测定土壤相关样本中蛋白酶（Pro）的活性。

实验原理：

本试剂盒应用双抗体夹心法测定标本中土壤蛋白酶（Pro）水平。用纯化的土壤蛋白酶（Pro）捕获抗体包被微孔板，制成固相抗体，往包被的微孔中依次加入土壤蛋白酶（Pro），再与 HRP 标记的检测抗体结合，形成抗体-抗原-酶标抗体复合物，经过彻底洗涤后加底物 TMB 显色。TMB 在 HRP 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土壤蛋白酶（Pro）呈正相关。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土壤蛋白酶（Pro）活性。

试剂盒组成：

试剂盒组成	48 孔配置	96 孔配置	保存
说明书	1 份	1 份	
封板膜	2 片	2 片	
密封袋	1 个	1 个	
酶标包被板	1×48	1×96	2-8℃ 保存
标准品	0.3ml×6 管	0.3ml×6 管	2-8℃ 保存
酶标试剂	5 ml×1 瓶	10 ml×1 瓶	2-8℃ 保存
样品稀释液	3 ml×1 瓶	6 ml×1 瓶	2-8℃ 保存
显色剂 A 液	3 ml×1 瓶	6 ml×1 瓶	2-8℃ 保存
显色剂 B 液	3 ml×1 瓶	6 ml×1 瓶	2-8℃ 保存
终止液	3 ml×1 瓶	6 ml×1 瓶	2-8℃ 保存
20×浓缩洗涤液	15ml×1 瓶	25ml×1 瓶	2-8℃ 保存

注：标准品浓度依次为：200、100、50、25、12.5、0 IU/L。

样本处理及要求：

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℃ 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℃ 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。

操作步骤

1. 标准品的加样：设置标准品孔和样本孔，标准品孔各加不同浓度的标准品 50 μL；
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 μL，然后再加待测样品 10 μL（样品最终稀释度为 5 倍）。加样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. 加酶：每孔加入酶标试剂 100 μL，空白孔除外。
4. 温育：用封板膜封板后置 37℃ 温育 60 分钟。
5. 配液：将 20 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 20 倍稀释后备用。
6. 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。
7. 显色：每孔先加入显色剂 A 50 μL，再加入显色剂 B 50 μL，轻轻震荡混匀，37℃ 避光显色 15 分钟。
8. 终止：每孔加终止液 50 μL，终止反应（此时蓝色立转黄色）。
9. 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。

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）

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。样本在使用前也要在室温平衡 60 分钟。
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。

技术提示：

- 1、混合蛋白溶液时，避免起泡。
- 2、加校准品与样本时，每个校准品浓度和样本都要更换移液枪头，公共组分应该悬臂加样，避免交叉污染。
- 3、合适的温育时间，和充分的洗涤步骤，是保证实验结果准确性的必要条件。
- 4、底物溶液为无色液体，保存过程中变为蓝色，代表底物溶液已经失效，不得使用。
- 5、终止液加样顺序与底物溶液加样顺序一致，加入终止液后，蓝色底物产物，会瞬间变为黄色。
- 6、实验中，用剩的板条，应立即放回自封袋中，密封（低温干燥）保存。
- 7、所有液体组分，使用前充分摇匀，严格按照说明书标明的时间、加样量及加样顺序进行温育操作。
- 8、检测必须符合实验室管理规范的规定，严格防止交叉污染，所有样品、洗弃液和各种废弃物都应按照传染物进行处置。

试剂盒性能：

1. 样品线性回归与预期浓度相关系数 R 值为 0.95 以上。
2. 批内变异系数与批间变异系数应分别小于 10% 和 15%。

检测范围：

6.25 IU/L - 200 IU/L

灵敏度：

最低检测浓度小于 1 IU/L

保存条件及有效期：

1. 试剂盒保存：2-8℃。
2. 有效期：6 个月

武汉吉立德生物科技有限公司

官网：www.giled.cn

电话：400-027-1626

13163358390

QQ : 34636662