

# 豚鼠 II 型胶原交联羧基端肽(CTX2) ELISA kit

本试剂盒仅供研究使用

## 使 用 说 明 书

- 货号：
- 检测范围：93.75 pg/mL-6000 pg/mL
- 灵敏度：31.25 pg/mL
- 试剂盒保存：2-8℃
- 种属：鼠
- 有效期：6个月

## 检测原理：

试剂盒采用“夹心法”：将豚鼠Ⅱ型胶原交联羧基端肽(CTX2)捕获抗体包被于酶标板上，捕获样品及标准品中的靶标，加入生物素标记的抗体与靶标结合，然后再加入酶结合物与生物素标记抗体结合，形成免疫复合物，加入TMB显色液后，若反应孔中有靶标则显蓝色，加入终止液变黄色，检测过程中游离的成分均被洗去，用酶标仪在450 nm处测OD值，颜色的深浅和样品中的豚鼠Ⅱ型胶原交联羧基端肽(CTX2)呈正比，通过绘制标准曲线计算出标本中靶标的浓度。

## 试剂盒组分：

| 名 称        | 规格（48T）  | 规格（96T）  |
|------------|----------|----------|
| 预包被酶标板     | 8×6条     | 8×12条    |
| 标准品        | 1支       | 1支       |
| 标准品/样品稀释液  | 10ml     | 15ml     |
| 生物素标记抗体    | 1支（100×） | 1支（100×） |
| 生物素标记抗体稀释液 | 10ml     | 15ml     |
| 酶结合物       | 1支（100×） | 1支（100×） |
| 酶结合物稀释液    | 10ml     | 15ml     |
| TMB显色液A    | 3ml      | 6ml      |
| TMB显色液B    | 3ml      | 6ml      |
| 终止液        | 3ml      | 6ml      |
| 20×浓缩洗涤液   | 10ml     | 10ml×2   |
| 封板胶纸       | 2张       | 4张       |
| 产品说明书      | 1份       | 1份       |

## 样本处理及要求：

**1.血清：**将收集于血清分离管的全血样本在室温放置2小时或2-8℃过夜，然后1000×g离心20分钟，取上清即可，或将上清置于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。

**2.血浆：**用EDTA或肝素作为抗凝剂采集样本，并将样本在采集后的30分钟内于2-8℃1000×g离心15分钟，取上清即可检测，或将上清置于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。

**3.组织匀浆：**用预冷的PBS (0.01M, pH=7.4)冲洗组织，去除残留血液（匀浆中裂解的红细胞会影响检测结果），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，于冰上充分研磨或匀浆机研磨。为了进一步裂解组织细胞，可以对匀浆液进行超声破碎，或反复冻融。最后将匀浆液于  $5000 \times g$  离心5~10分钟，取上清检测。

**4.细胞培养物上清：**请  $1000 \times g$  离心20分钟，取上清即可检测，或将上清置于  $-20^{\circ}\text{C}$  或  $-80^{\circ}\text{C}$  保存，但应避免反复冻融。

**5.细胞裂解液：**贴壁细胞用预冷PBS轻轻清洗，然后用胰蛋白酶消化  $1000 \times g$  离心5分钟后收集细胞；悬浮细胞可直接离心收集。收集的细胞用预冷PBS清洗3次，每  $1 \times 10^6$  个细胞中加入150-200  $\mu\text{L}$  PBS重悬（推荐在PBS中加入蛋白酶抑制剂；若含量很低可适当减少PBS体积）并通过反复冻融或超声使细胞破碎。将提取液于  $2-8^{\circ}\text{C}$ ，  $1500 \times g$  离心10分钟，取上清检测。

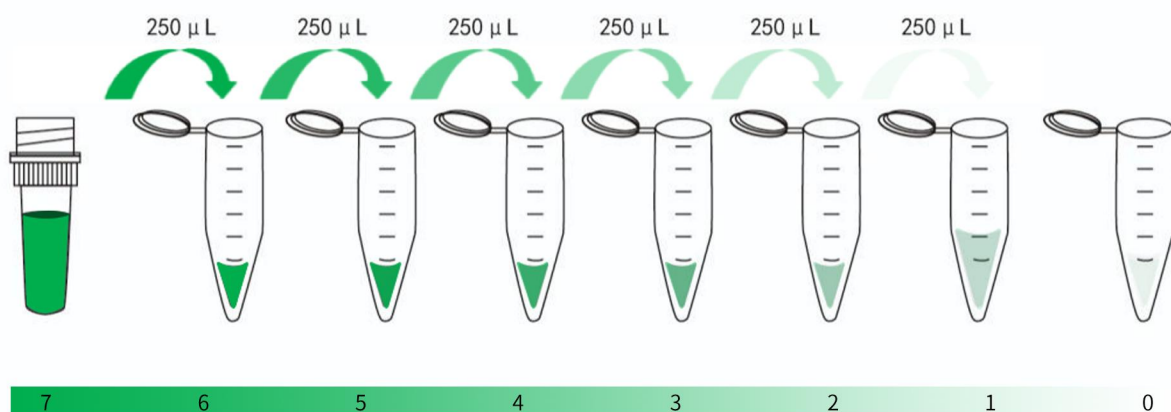
**6.其它生物样本：**  $1000 \times g$  离心20分钟，取上清即可检测。

### 检测前试剂准备：

1.提前20分钟从冰箱中取出试剂盒，平衡至室温。读数前15分钟打开酶标仪预热。

2.洗涤液配置：用蒸馏水1:20稀释（例：1ml 浓缩洗涤液加入 19ml 的蒸馏水）。

**3.标准品配制：**试剂盒中取出标准品，加入1ml标准品/样品稀释液溶解，盖好后室温静置大约 10 分钟。取 7 个 1.5ml 离心管，分别标注S6,S5,S4,S3,S2,S1,S0 后每管各加入 250  $\mu\text{l}$  标准品/样品稀释液。从S7中吸取 250  $\mu\text{l}$  标准品到第一个离心管S6中，轻轻吹打混匀。从 S6 中吸取 250  $\mu\text{l}$  到第二个 EP 管中(S5)，轻轻吹打混匀。依次倍比稀释浓度为4000pg/mL, 2000pg/mL, 1000pg/mL, 500 pg/mL, 250pg/mL, 125pg/mL, 62.5pg/mL。以此类推进行标准品的倍比稀释。S0为标准品/样品稀释液(0pg/mL)。



**4.生物素标记抗体工作液配置:**使用前 20 分钟,用生物素标记抗体稀释液将 100×生物素标记抗体稀释成 1×工作液,根据所需用量配置,当日使用,剩余弃之。

**5.酶结合物工作液配置:**使用前 20 分钟,用酶结合物稀释液将 100×酶结合物稀释成 1×工作液,根据所需用量配置,当日使用,剩余弃之。

**6.TMB 显色液的配置:**使用前 10 分钟,将 TMB 显色液 A 液和 B 液 1:1 混合,避光放置备用

7.如果您检测的样本中靶标浓度高于标准品最高值,请根据实际情况选择适当的稀释倍数(建议:将待测样本用样品稀释液最低稀释 1 倍,在正式实验之前做预实验,以确定具体稀释倍数)。

## 检测程序:

**1.加样:**空白孔加入 100μl 标准品/样品稀释液,其余孔各加入标准品或待测样品 100ul,将反应板混匀后置 37℃,60 分钟。

////////

**2.弃液:**弃去液体,甩干,不用洗涤

////////////////////

**3.加抗体:**每孔加入 100ul 生物素标记抗体工作液100ul,混匀后置 37℃,60 分钟。

////////////////////

**4.洗板:**用 1×洗涤液将反应板充分洗涤 4-6 次,每孔加入 1×洗液 350μl,每次震荡/浸泡 1-2 分钟,在滤纸上拍干。

////////////////////

**5.加酶结合物:**每孔加入酶结合物工作液 100ul,混匀后置 37℃,30 分钟。

////////////////////

**6.洗板:**同步骤4。

////////////////////

**7.加显色液:**每孔加入提前配置好的 TMB 混合液 100ul,混匀后置 37℃暗处反应 10-20 分钟(具体显色时间根据显色结果而定)。

////////////////////

**8.加终止液:**每孔加入 50ul 的终止液,混匀,用酶标仪在 450nm 处测吸光值。

////////////////////

## 检测程序总结：

- 1.加样品及标准品，37℃反应 60 分钟。
- 2.加生物素标记抗体，37℃反应 60 分钟。洗涤 4-6 次。
- 3.加酶结合物，37℃反应 30 分钟。洗涤 4-6 次。
- 4.加TMB显色液，37℃反应 10-20 分钟。
- 5.加入终止液，读数。

## 注意事项

- 1.试剂盒从冷藏环境中取出应在室温平衡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。

## 保存条件及有效期

- 1.试剂盒保存：2-8℃。
- 2.有效期：6个月