

ELISA试剂盒使用说明书

Human Myeloperoxidase ELISA Kit

全国统一热线：400-600-4213
www.biosharp.cn

本试剂盒用于定量检测人血清、血浆（血小板去除）、尿液或细胞培养上清液等样本中天然和重组Myeloperoxidase浓度。使用前请仔细阅读说明书并检查试剂组分，如有任何疑问请与合肥兰杰柯科技有限公司联系，公司将为您提供强有力的技术支持。

目录

| | |
|----------------|---|
| 一、产品简介 | 2 |
| 二、检测原理 | 2 |
| 三、试剂盒组分 | 3 |
| 四、储存条件 | 3 |
| 五、注意事项 | 3 |
| 六、其它实验材料 | 4 |
| 七、使用说明 | 4 |
| 1、样品收集、处理及保存方法 | 4 |
| 2、试剂准备 | 4 |
| 3、操作步骤 | 5 |
| 4、操作流程图 | 6 |
| 5、操作要点提示 | 6 |
| 6、结果判断 | 6 |
| 八、常见问题分析及解决 | 8 |

Human Myeloperoxidase (髓过氧化物酶) ELISA KIT

| 货号 | 名称 | 规格 |
|--------------|--|-----|
| BSEH-113-48T | Human Myeloperoxidase (髓过氧化物酶) ELISA KIT | 48T |
| BSEH-113-96T | Human Myeloperoxidase (髓过氧化物酶) ELISA KIT | 96T |

一、产品简介

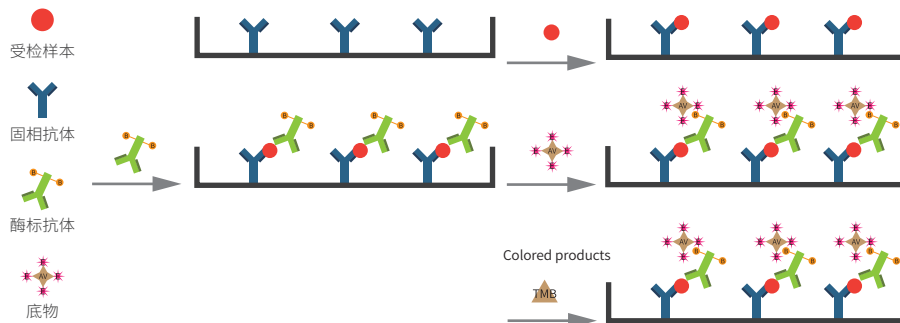
髓过氧化物酶 (MPO) 是属于过氧化物酶XPO亚家族中一种含血红素的酶。它是一种富含于嗜中性粒细胞和单核细胞的糖蛋白,能催化过氧化氢是依赖于次氯酸(HClO)和其他反应性物质的形成。这些化合物与大分子的反应导致酪氨酸残基,脂质和胆固醇的亚硝基化,氯化化和氧化,以及蛋白质和DNA的分子间交联。MPO作为前原蛋白合成,其被蛋白水解加工以去除一个含48个氨基酸(aa)的信号肽,116个氨基酸的前肽,C末端丝氨酸和6个氨基酸的内部肽来产生分开的60kDa重链和12kDa轻链。MPO的其他翻译后修饰包括进入血红素,糖基化和甘露糖残基的磷酸化。具有酶活性的MPO是二硫键连接的四聚体,其含有两个血红素基团和每个重链和轻链中的两个复制区。交替剪接会产生另外两种MPO的同型体,一种在轻链中具有32个氨基酸插入,另一个具有信号序列缺失和前肽的47个氨基酸。成熟的人MPO与小鼠和大鼠的MPO共享87-88氨基酸序列同源性。

MPO能结合白蛋白巨噬细胞甘露糖受体,血管内皮细胞上的细胞角蛋白1,高分子量激肽原和中性粒细胞上的整联蛋白CD11b / CD18。这些相互作用促进MPO清除,减少一氧化氮和缓激肽水平,减少血管舒张和持续的中性粒细胞活化。MPO基因表达受甲状腺激素、视黄酸、雌激素和PPAR γ 受体的控制。MPO基因启动子内的多态性会增加类固醇反应性,并且与多种疾病的发展或严重程度相关。

中性粒细胞MPO储存在细胞质天蓝色颗粒中。在细胞活化和脱颗粒后,MPO被递送到吞噬体中,因为它是杀死吞噬细菌必需条件。活化的嗜中性粒细胞也释放颗粒内容物细胞外。升高的血浆MPO水平与多种临床病症相关,包括全身性炎症,心病,心血管事件的风险,血管内皮功能障碍,多发性硬化的严重程度,以及血液透析期间的预期死亡率和氧化应激。MPO水平在关节滑液和牙龈炎流体中也升高。MPO被掺入动脉粥样硬化斑块和肾结石中,可用作炎症或受损组织的嗜中性粒细胞浸润的指示剂。

二、检测原理

本实验采用双抗体夹心ELISA。用抗人Myeloperoxidase单克隆抗体预包被酶标板,加入适度稀释的样本和标准品,其中的Myeloperoxidase会与其单抗结合,洗去游离成分;加入生物素化的抗人Myeloperoxidase抗体,抗人Myeloperoxidase抗体与结合在单抗上的人Myeloperoxidase结合而形成免疫复合物,洗去游离的成分;加入辣根过氧化物酶标记的亲合素,生物素与亲合素特异性结合,洗去未结合的酶结合物;加入显色剂,若反应孔中有Myeloperoxidase,辣根过氧化物酶会使无色的显色剂现蓝色;加终止液变黄。在450nm下测OD值,Myeloperoxidase浓度与OD₄₅₀值之间呈正比,可通过绘制标准曲线计算出标本中Myeloperoxidase浓度。



三、试剂盒组成

| 组分编号 | 组分 | 96t | 48t | 储存条件 |
|-------------|------------|------|-----|-------|
| BSEH-113-1 | 标准品 | 2支 | 1支 | -20°C |
| BSEH-113-2 | 标准品和标本稀释液 | 2瓶 | 1瓶 | 2-8°C |
| BSEH-113-3 | 浓缩生物素化抗体 | 2支 | 1支 | 2-8°C |
| BSEH-113-4 | 生物素化抗体稀释液 | 1瓶 | 1瓶 | 2-8°C |
| BSEH-113-5 | 浓缩酶结合物(避光) | 2支 | 1支 | 2-8°C |
| BSEH-113-6 | 酶结合物稀释液 | 1瓶 | 1瓶 | 2-8°C |
| BSEH-113-7 | 浓缩洗涤液20× | 1瓶 | 1瓶 | 2-8°C |
| BSEH-113-8 | 显色剂(避光) | 1瓶 | 1瓶 | 2-8°C |
| BSEH-113-9 | 终止液 | 1瓶 | 1瓶 | 2-8°C |
| BSEH-113-10 | 抗体包被板条 | 8×12 | 8×6 | 2-8°C |
| BSEH-113-11 | 封板胶纸 | 4张 | 2张 | 2-8°C |
| | 说明书 | 1份 | 1份 | |

四、储存条件

未启封试剂盒2-8°C保存有效期6个月,启封后建议一个月内使用完毕。产品收到后标准品-20°C保存,其它组分2-8°C保存。

五、注意事项

- 1、试剂盒保存在2-8°C,除复溶后的标准品,其它成分不可冷冻。
- 2、浓缩生物素化抗体、浓缩酶结合物装量极少,运输中颠簸和可能的倒置会使液体沾到管壁或瓶盖。使用前请离心处理以使附着于管壁或瓶盖的液体沉积到管底。
- 3、不同批号试剂不可混用。
- 4、为避免交叉污染请使用一次性吸头。
- 5、终止液和显色剂具腐蚀性,避免皮肤及粘膜直接接触,一旦接触到这些液体,请尽快用大量水冲洗。
- 6、使用干净的塑料容器配制洗涤液,使用前充分混匀试剂盒里的各种成份及样品。
- 7、洗涤酶标板时应充分拍干,不要将吸水纸直接放入酶标反应孔中吸水。
- 8、不要用其它来源的试剂混合或替代该产品的组分,不同批号的试剂盒组份不能混用,请在有效期内使用本产品。
- 9、在试验中标准品和样本检测时建议作双复孔或三复孔,加入试剂的顺序应一致,以保证所有反应孔孵育的时间一样。
- 10、充分混匀对反应结果尤为重要,最好使用微量振荡器(使用最低频率进行振荡)。
- 11、避免操作过程中酶标板干燥,干燥会使酶标板上生物成分迅速失活,影响实验结果。
- 12、适当的稀释样品,使样品值落在标准曲线范围内,根据待测因子含量高、中、低的不同,建议采用1:100、1:10、1:2稀释样品。如果样品OD值高于最高标准,适当增加稀释度并重复检测。
- 13、标准品稀释液,操作人,移液方式,洗涤方法,孵育时间及温度,试剂盒批次的不同均可能会导致结果的差异。
- 14、此法可有效的消除可溶性受体、结合蛋白以及生物样品中的其他因素的干扰。

六、其它实验材料

- 1、酶标仪(450nm)
- 2、高精度可调移液器及吸头:0.5-10, 2-20, 20-200, 200-1000 μ L;一次检测样品较多时,最好用多通道移液器
- 3、自动洗板机或洗瓶
- 4、37 $^{\circ}$ C温箱
- 5、双蒸水或去离子水
- 6、坐标纸
- 7、量筒

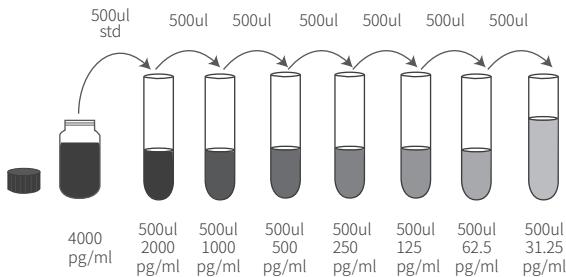
七、使用说明

7.1 样品收集、处理及保存方法

- 1.血清:使用不含热原和内毒素的试管,收集血液后,室温凝血30min,1000 \times g离心10min,小心分离血清。
- 2.血浆(血小板去除):在冰上用EDTA、肝素作为抗凝剂收集血浆,收集后30min内以1000 \times g离心15min去除颗粒。建议离心分离后的血浆再10,000 \times g离心(2-8 $^{\circ}$ C)10min,去除血小板。
- 3.细胞上清液:1000 \times g离心10min去除颗粒和聚合物。
- 4.尿液:收集晨起中段尿,离心去除颗粒物。
- 5.保存:若样品不立即检测,请将其按一次用量分装,-20 $^{\circ}$ C~-70 $^{\circ}$ C保存,避免反复冻融。尽量避免使用溶血或高血脂样本。如果血清中含有大量颗粒,检测前先离心或过滤去除;室温下解冻,请勿于37 $^{\circ}$ C或更高的温度加热解冻。
- 6.稀释:可根据实际情况,将标本做适当倍数稀释(建议做预实验,以确定稀释倍数)。
注:正常人血清:建议1:60稀释,血浆样本建议1:25稀释。

7.2 试剂准备

- 1、提前30min从冰箱中取出试剂盒,平衡至室温。
- 2、洗涤缓冲液:从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶,这属于正常现象,加热并轻轻摇晃使结晶完全溶解后再配制。将浓缩洗涤液用双蒸水稀释(1:20)。未用完的放回4 $^{\circ}$ C。
- 3、标准品:加入标准品/标本稀释液1.0mL至冻干标准品中,待彻底溶解后,静置15分钟混匀(浓度为4000pg/mL),然后根据需要进行稀释,见下图(建议标准曲线使用以下浓度:4000、2000、1000、500、250、125、62.5、31.25、0pg/mL)。稀释的标准品不得重复使用,未用完的标准品应按照一次用量分装后,将其放在-20~-70 $^{\circ}$ C贮存,一次性使用,避免反复冻融。



标准品稀释方法

4. 生物素化抗体工作液: 根据每孔需要100 μ L来计算总的用量, 多配制100-200 μ L。以生物素化抗体稀释液稀释浓缩生物素化抗体(1:100)。最好现用现配。

浓缩生物素化抗体稀释方法

| 所用板条数 | 浓缩生物素化抗体 | + | 生物素化抗体稀释液 |
|-------|-------------|---|---------------|
| 12 | 110 μ L | + | 10890 μ L |
| 10 | 90 μ L | + | 8910 μ L |
| 8 | 70 μ L | + | 6930 μ L |
| 6 | 50 μ L | + | 4950 μ L |
| 4 | 33 μ L | + | 3267 μ L |
| 2 | 17 μ L | + | 1683 μ L |
| 1 | 9 μ L | + | 891 μ L |

5. 酶结合物工作液: 以酶结合物稀释液稀释浓缩酶结合物(1:100)。最好现用现配。

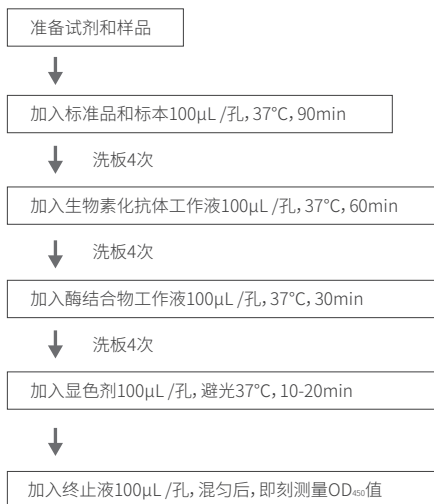
浓缩酶结合物稀释方法

| 所用板条数 | 浓缩酶结合物 | + | 酶结合物稀释液 |
|-------|-------------|---|---------------|
| 12 | 110 μ L | + | 10890 μ L |
| 10 | 90 μ L | + | 8910 μ L |
| 8 | 70 μ L | + | 6930 μ L |
| 6 | 50 μ L | + | 4950 μ L |
| 4 | 33 μ L | + | 3267 μ L |
| 2 | 17 μ L | + | 1683 μ L |
| 1 | 9 μ L | + | 891 μ L |

7.3 操作步骤

1. 按照上述准备工作配制好各种溶液。
2. 根据待测样品数量和标准品的数量决定所需的板条数, 并增加1孔作为空白对照孔。分别将标本和不同浓度标准品(100 μ L/孔)加入相应孔中(零孔只加标准品/样本稀释液), 用封板胶纸封住反应孔, 37 $^{\circ}$ C孵箱孵育90分钟(空白对照孔除外)。
3. 洗板4次: (1)自动洗板机: 要求注入的洗涤液为350 μ L, 注入与吸出间隔15-30秒。(2)手工洗板: 甩尽孔内液体, 每孔加洗涤液350 μ L, 静置30秒后甩尽液体, 在厚透吸水纸上拍干。
4. 加入生物素化抗体工作液(100 μ L/孔)。用封板胶纸封住反应孔, 37 $^{\circ}$ C孵箱孵育60分钟(空白对照孔除外)。
5. 洗板4次。
6. 加入酶结合物工作液(100 μ L/孔)。用封板胶纸封住反应孔, 37 $^{\circ}$ C孵箱孵育30分钟(空白对照孔除外)。
7. 洗板4次。
8. 加入显色剂100 μ L/孔, 避光, 37 $^{\circ}$ C孵箱孵育10-20分钟。
9. 加入终止液100 μ L/孔, 混匀后即刻测量OD₄₅₀值(5分钟内)。

7.4 操作流程图



7.5 操作要点提示

- 1、配制各种试剂时要充分混匀, 但要避免产生大量泡沫, 以免加样时加入大量的气泡, 产生加样误差。
- 2、为避免交叉污染, 在加入不同浓度的标准品、不同样品、不同试剂时谨记及时更换吸头。
- 3、为了确保准确的结果, 在每次孵育前均需使用新封板胶纸封住反应孔。
- 4、显色剂在添加之前, 应保持无色, 请勿使用已变为蓝色的显色溶液。最佳显色时间对标准曲线很重要, 肉眼可见前3-4孔有梯度蓝色, 后3-4孔差别不明显, 零孔无蓝色出现即可终止。
- 5、每次检测均要做标准曲线, 根据样品待测因子的含量, 适当稀释或浓缩样本, 最好做预实验。

7.6 结果判断

- 1、每个标准品和标本的OD值应减去空白孔的OD值, 如果做复孔, 求其平均值。
- 2、使用计算机软件以吸光度OD值为纵坐标(Y), 相应的Myeloperoxidase标准品浓度为横坐标(X), 生成相应的标准曲线, 样品的Myeloperoxidase含量可根据其OD值由标准曲线换算出相应的浓度。
- 3、若标本OD值高于标准曲线上限, 应当适当稀释后重测, 计算浓度时应乘以稀释倍数算标本含量。

参考数据

| 标准品浓度(pg/mL) | OD值1 | OD值2 | 平均值 | 矫正值 |
|--------------|-------|-------|-------|-------|
| 0 | 0.010 | 0.008 | 0.009 | — |
| 62.5 | 0.051 | 0.043 | 0.047 | 0.038 |
| 125 | 0.097 | 0.089 | 0.093 | 0.084 |
| 250 | 0.203 | 0.191 | 0.197 | 0.188 |
| 500 | 0.440 | 0.422 | 0.431 | 0.422 |
| 1000 | 0.849 | 0.831 | 0.840 | 0.831 |
| 2000 | 1.586 | 1.567 | 1.577 | 1.568 |
| 4000 | 2.730 | 2.692 | 2.711 | 2.702 |

八、常见问题分析及解决

| 问题 | 可能原因 | 解决办法 | |
|------------------------------------|---------------------------------------|--|----------------------------|
| 无颜色 | 不同试剂盒或不同批号的试剂混合 | 重新检查试剂的标签, 确保所有组分都属于正使用的试剂盒中的。不能混用不同试剂盒或不同批号的试剂。 | |
| | 漏加酶 | 检查操作流程, 注意不要漏加 | |
| | HRP酶污染了叠氮钠 试剂配制/使用有误 | 使用新配制的试剂, 禁叠氮钠 重做试验, 严格按照说明书操作, 每次配制和使用前看清标签 | |
| 显色弱 | 超过有效期的产品可能会产生很弱的信号 | 检查产品有效期 | |
| | 缩短孵育时间能使实验信号变弱 | 检查孵育时间 | |
| | 使用了被污染的试剂 | 检查试剂是否被污染 | |
| | 仪器设定不正确, 滤光片不匹配 | 仪器是否设定正确, 滤光片的使用等 | |
| | 洗涤操作不规范 | 洗涤不充分, 使用手工洗板常出现 | 洗板不充分, 使用手工洗板常出现 |
| | | 洗瓶洗涤, 每孔应完全充满洗涤缓冲液, 倾出时应迅速 | 洗瓶洗涤, 每孔应完全充满洗涤缓冲液, 倾出时应迅速 |
| 若用洗板机, 应校准并设定足够充满每孔的体积量, 板内侧不应接触设备 | | 若用洗板机, 应校准并设定足够充满每孔的体积量, 板内侧不应接触设备 | |
| 检查每孔是否有残留的洗液或每孔加样量的体积是否准确 | | 检查每孔是否有残留的洗液或每孔加样量的体积是否准确 可在两次洗板之间加30秒的浸泡 | |
| 高背景 | 实验中孵育温度和时间不适当 | 确定每一试验步骤的孵育温度和时间是否适当 | |
| | 酶过量过多 | 加酶前检查移液器调节量是否准确 检查稀释度, 必要时进行效价测定 | |
| 全部板子变成规则的蓝色 | 不充分的洗涤/洗涤步骤被遗漏使没结合的HRP仍有残留 | 最好使用洗板机充分洗涤 检查每孔是否有残留的洗液或加样量是否准确 | |
| | 太多的酶结合物 | 检查稀释度, 必要时进行效价测定 | |
| 高CV值花板 | 封板膜或试剂容器被重复使用, 导致HRP残留, 使TMB底物产生非特异蓝色 | 使用新封板膜, 每步使用不同的试剂容器 | |
| | 操作不慎或洗涤不充分 | 按说明书洗板、加样和显色, 洗板尤为重要 | |
| | 出现干板, 没有使用封板膜、封板膜重复使用 | 确定每两步骤间酶标板应保持湿润 使用封板膜封口, 注意每步使用新鲜的封板膜 | |
| 标准曲线可得到, 但两点之间区别很差(低或平的曲线) | 移液器不准确, 吸头重复使用 | 检查并校准移液器, 每次取样必须更换吸头 | |
| | 酶结合物不足 | 检查稀释度, 必要时进行效价测定 | |
| | 检测抗体不足 | 检查稀释度, 必要时进行效价测定 | |
| | 板子显色不足 | 延长底物孵育时间 使用推荐品牌的底物溶液 | |
| 标准曲线很好, 但没有任何期望的阳性信号 | 标本中无相应的待检测物质 | 使用内参对照 重复实验, 重新考虑实验的相应参数 | |
| | 标本基质遮盖检测 | 将标本至少做1:2相应的稀释, 或进行系列稀释 | |
| 标准曲线很好, 但标本的判读值很高 | 标本中含的待检物质水平超过实验范围 | 稀释标本 | |
| 边缘效应 | 工作环境温度不均衡 | 避免将板子在变化温度环境中孵育 | |
| 漂移 | 实验过程中出现间断 | 整个实验应连续操作, 在实验开始前将所有的标准品和标本做适当的准备。 | |
| | 试剂没有按说明书平衡至室温 | 在所有试剂加入孔前, 确保它们已平衡至室温, 除非说明书中有另外的要求。 | |
| | 是否可更改试剂盒所提供的操作步骤? | 一般厂商为确保最高的灵敏度, 对试剂盒都进行了优化, 为确保每一试剂盒实验的规范性应按说明书操作。 | |
| | 是否可混用不同批次试剂盒中的试剂? | 不可以, 绝大多数试剂在每批试剂盒中是特异的, 若有问题可与厂家或代理商联系。 | |
| | 是否可增加或减少标本的体积? | 商品化的试剂盒所需加入的标本体积是优化的, 应按说明书操作, 不建议更改所加标本体积。 | |
| | 是否可重新确定自己的标准曲线的点? | 可以。说明书上有建议制备标准曲线时标准品的稀释度, 可改变稀释倍数和增加曲线的点, 但是必须在实验范围内, 高于试剂盒中最高标准品的点和低于灵敏度以下的点是无效的。 | |

