

人凝血酶酶联免疫吸附测定试剂盒

产品编号: MA1030 规格: 96 次

产品内容

产品组成	体积/数量
人 Thrombin 预包被板	8 孔条×12 个
样品稀释液	30 mL
重组人 Thrombin 标准品(冻干)	2 支(50 ng/支)
生物素标记人 Thrombin 抗体	130 μL(效价 1:100)
抗体稀释液	12 mL
酶复合物(HRP 标记的链霉亲和素)	130 μL(效价 1:100)
酶复合物稀释液	12 mL
浓缩洗涤液(25×)	30 mL
显色剂 TMB	10 mL
终止液	10 mL
封板胶纸	4 张

产品简介

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法,用于检测样品中人 Thrombin 的浓度。人 Thrombin 捕获抗体已经预包被于酶标板上,当加入样品或标准品时,其中的人 Thrombin 会与捕获抗体结合,而其它游离成分则会通过洗涤被除去。接着,再加入生物素标记的人 Thrombin 抗体后,抗人 Thrombin 抗体与人 Thrombin 结合,形成夹心的免疫复合物,其它游离成分则通过洗涤被除去。随后加入酶复合物,生物素与酶复合物特异性结合,这样酶复合物上的 HRP 就与夹心的免疫复合物连接起来,而其它游离成分则通过洗涤被除去。最后加入显色剂,若样品中存在人 Thrombin,则会形成免疫复合物,其上连接的 HRP 会催化无色的显色剂氧化生成蓝色物质,而后加入终止液,最终产物呈黄色。通过酶标仪检测,读取 450 nm 处的 OD 值,人 Thrombin 浓度与 OD450 值之间呈正比,通过检测标准品绘制标准曲线,对照未知样品中 OD 值,即可计算出样品中人 Thrombin 的浓度。

凝血酶 (Thrombin) 是一种丝氨酸蛋白酶,在血液凝固中起核心作用。它通过将可溶性的纤维蛋白原转化为不溶性的纤维蛋白,形成稳定的血凝块。Thrombin 由凝血因子 Xa 从凝血酶原中生成,其活性受到抗凝血酶 III 和肝素等抑制因子的严格调控,同时也具有正反馈机制来放大凝血反应。

在临床上, Thrombin 被用作局部止血药物,也用于严重出血的治疗。过量的凝血酶可能导致血栓形成,而不足则与血友病等出血性疾病相关。Thrombin 时间检测可评估凝血功能,检测纤维蛋白原异常或肝素效果。此外, Thrombin 还通过蛋白酶激活受体调节炎症、血管生成和组织修复,在健康与疾病中都发挥着重要作用。



产品参数:

检测范围	1.56 ng/mL~100 ng/mL
敏感性	380 pg/mL
特异性	系统和其它因子无交叉反应
样本类型	人血清、血浆、体液、组织匀浆或细胞培养上清

使用方法

(一) 样品制备

1.根据样品种类选择相应的处理方法:

(1) 细胞上清: 将细胞培养上清液100~500×g离心5min, 去除悬浮物后即可。

(2) 血清样品: 将全血在室温下静置0.5~2h, 待其自然凝固并析出血清后, 离心取黄色上清即可(4℃, 1,000~2,000×g, 10min), 注意请勿吸取沉淀, 制备好的血清需置于冰上待用, 请勿在其中添加任何防腐剂或抗凝剂;

(3) 血浆样品: 使用EDTA对全血进行抗凝处理后, 混合均匀置于冰上, 离心取黄色上清即可(4℃, 1,000~2,000×g, 10min), 注意请勿吸取沉淀, 制备好的血浆需置于冰上待用;

(4) 组织匀浆/体液: 离心去除沉淀即可。

注意:

①若待测样品无法及时检测, 样品制备完成后, 请分装冻存于-20℃, 避免反复冻融;

②请保证待测样品清澈透明, 检测前如发现样品中有悬浮物, 需通过离心去除;

③为了保证检测结果准确, 请勿使用溶血、黄疸、高血脂或污染的样品。

2.稀释样品

查阅相关文献, 预估样品中待测因子的含量, 从而确定适当的稀释倍数, 使稀释后样品中待测因子的浓度处于ELISA试剂盒的最佳检测范围。根据待测因子含量的不同, 分别采取不同的稀释方案:

(1)待测因子含量在 1,000~10,000 ng/mL 范围内, 一般按 1:100 稀释, 即向 297 μL 样品稀释液中加入 3 μL 样品;

(2) 待测因子含量在 100~1,000 ng/mL 范围内, 一般按 1:10 稀释, 即向 225 μL 样品稀释液中加入 25 μL 样品;

(3) 待测因子含量在 1.56~100 ng/mL 范围内, 一般按 1:2 稀释, 即向 100 μL 样品稀释液中加入 100 μL 样品;

(4) 待测因子含量≤1.56 ng/mL, 样品一般无需稀释。

以上方案仅供参考, 实验中请详细记录样品的稀释方法。

(二) 检测准备工作

3.试剂盒自4℃冰箱取出后, 请置于室温平衡20min; 如从-20℃取出, 各组分需彻底融化后再平衡20min; 检测完成后, 剩余试剂请及时置于4℃或-20℃保存。



4.将浓缩洗涤液(25×)用双蒸水或去离子水稀释成1×洗涤液。

5.重组人 Thrombin 标准品的稀释和使用(在使用前2h内准备, 室温操作, 请严格控制在 25~28℃)

(1) 配制 100 ng/mL 标准品: 取 0.5 mL 样品稀释液加入标准品管内, 盖好后静置 15 min 以上, 然后反复颠倒 / 搓动以助溶解;

(2) 按下表将 100 ng/mL 标准品用样品稀释液进行倍比梯度稀释。(最高浓度为 100 ng/mL, 将标准品稀释液作为浓度 0 ng/mL。)

管号	稀释液用量(μL)	复溶后标准品用量(μL)	标准品的最终浓度(ng/mL)
A	0	1000	100
B	300	300(从A管取出)	50
C	300	300(从B管取出)	25
D	300	300(从C管取出)	12.5
E	300	300(从D管取出)	6.25
F	300	300(从E管取出)	3.12
G	300	300(从F管取出)	1.56
H	300	0	0

注意: 标准品复溶加样后, 剩余部分请丢弃。

6.准备生物素标记人 Thrombin 抗体工作液 (需在使用前 1 h 内准备)

(1) 按每孔需添加100μL抗体工作液, 计算其总用量(为弥补操作中的损耗, 需多配制 100~200μL);

(2) 按1μL生物素标记人 Thrombin 抗体添加99μL抗体稀释液的比例配制工作液, 轻轻混匀。

7. 准备酶复合物工作液 (需在使用前 1 h 内准备)

(1) 按每孔需添加 100 μL 酶复合物工作液, 计算其总用量 (为弥补操作中的损耗, 需多配制100~200 μL) ;

(2) 按 1 μL 酶复合物 添加 99 μL 酶复合物稀释液 的比例配制工作液, 轻轻混匀。

(三) 检测流程

8.通过计算确定一次实验所需的板条数, 取出所需板条放置于框架内, 多余的板条请放回铝箔袋密封, 保存于4℃或-20℃。

注意:

①标准品和样品建议做双复孔检测;

②每次实验均需绘制标准曲线。

9.将用样品稀释液稀释后的样品和不同浓度标准品(100μL/孔)分别加入相应孔中, 用封板胶纸封住反应孔, 37℃孵育90min。

注意:

①请查阅相关文献确定样品中待检测蛋白的大致浓度, 若其大于本试剂盒标准曲线的最大标准品浓度, 请将样品适当稀释后再进行检测;

②整个加样过程不宜超过10min, 否则可能会影响检测结果。

10.甩去酶标板内液体, 无需洗板, 将板倒扣在吸水纸上拍干。



11.加入稀释后的生物素标记人 Thrombin 抗体工作液(100 μ L/孔),用封板胶纸封住反应孔,37℃孵育60min。

12.洗板5次,每孔1 $\times$ 洗涤液用量为300 μ L,注入与吸出间隔15~30s,洗完后将板倒扣在吸水纸上拍干。

注意: 洗涤过程至关重要,洗涤不充分会导致结果产生较大误差。

13.加入稀释后的酶复合物 (100 μ L/ 孔),用封板胶纸封住反应孔,37℃避光孵育 30 min;

14.洗板 5 次,方法同步骤 12;

15.加入显色剂 TMB(100 μ L/ 孔),用封板胶纸封住反应孔,避光 37℃反应 10~25 min。

注意:

① 在保存和使用时,请勿将 TMB 接触氧化剂和金属;

② 因实验室条件差异,最佳显色时间会有所不同,反应充分时肉眼可见标准品的前 3~4 孔有明显的梯度蓝色。

16.加入终止液(100 μ L/孔),混匀后即刻使用酶标仪测量OD450,同时设定540nm或570nm作为校正波长,即可计算得到校正吸光度值(OD450-OD540或OD450-OD570);

注意: 读取OD值建议在10min内完成。

(四) 数据分析

17.绘制标准曲线。以标准品浓度作横坐标,OD值作纵坐标,利用计算机软件作四参数逻辑(4-PL)曲线拟合创建标准曲线,通过样品的OD值即可在标准曲线上计算出其相应浓度。

注意:

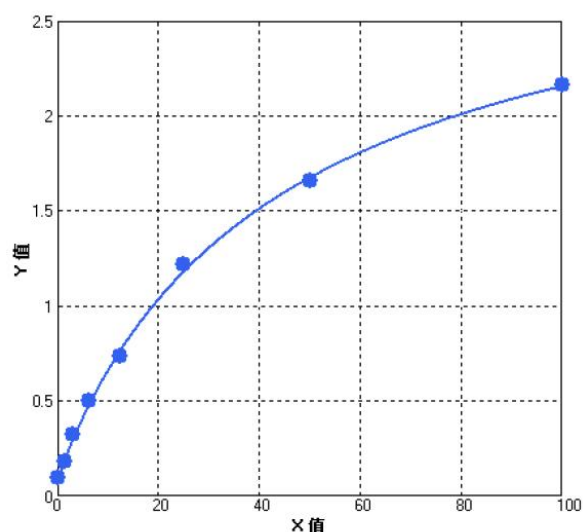
①复孔OD值在20%的差异范围内结果才有效,复孔OD值取平均后可作为测量值;

②若样品OD值高于标准曲线上限,应适当稀释后重测,计算浓度时应乘以稀释倍数。

标准曲线范例

人 Thrombin 参考标准曲线

标准品浓度	O.D.
0 ng/mL	0.095
1.56 ng/mL	0.182
3.12 ng/mL	0.326
6.25 ng/mL	0.500
12.5 ng/mL	0.732
25 ng/mL	1.218
50 ng/mL	1.661
100 ng/mL	2.160



注意: 本图仅供参考,应以同次试验标准品所绘标准曲线计算样品含量。



保存条件

2~8℃保存，自生产之日起6个月有效；长期储存请置于-20℃，自生产之日起12个月有效。

注意事项

- 1.浓缩洗涤液低温情况下可能会出现结晶，请水浴加热使结晶完全溶解后再配制工作液；
- 2.严禁混用不同批号试剂盒的组分；
- 3.加样过程请避免产生气泡，实验操作过程中一定要保证试剂充分混匀，否则会使结果产生较大误差；
- 4.说明书中提到的室温条件，请严格控制在25~28℃；
- 5.为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；
- 6.本产品仅限科研使用。

S250302

