猴抗肝细胞膜抗体（LMA）elisa试剂盒说明书

elisa试剂盒常见组成部分：

1）酶和底物：在ELISA中zui常用的酶为HRP和ALP。

2）抗体：在ELISA中应用的抗体可分为多克隆抗体(多抗)和单克隆抗体(单抗)。

3）抗原：在ELISA中应用的抗原要求有较高的特异性、亲和力和纯度。主要有三类，即自然抗原、人工合成抗原和基因重组抗原。

4 包被：将免疫活性物质(抗原或抗体)结合于固相载体上的过程称为包被。常用的材料有聚苯乙烯、硝酸纤维薄膜等；常用的方法有吸附法、化学交联法及亲和素-生物素间接包被法

5）固相载体：固相载体是ELISA中用以分离结合标记物和游离标记物的主要手段，应与各种免疫活性物质有良好的结合性能并且不改变其免疫活性。常用的固相载体有聚苯乙烯塑料和硝酸纤维素膜。

样本实验前准备：

ELISA试剂盒液体样本：包括血清、血浆、尿液、胸腹水、脑脊液、细胞培养上清等。

（1）血清

室温血液自然凝固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，应再次离心。

（2）血浆：

应根据标本的要求选择EDTA、柠檬酸钠或肝素作为抗凝剂，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、脑脊液参照此实行。

（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。

（5）培养细胞

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。通过反复冻融或加入组织蛋白萃取试剂，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。

（6）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），或组织蛋白萃取试剂, 用手工或匀浆器将标本匀浆化。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。

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di一、第二孔中分别加标准品100μl，然后在di一、第二孔中加标准品稀释液50μl，混匀；然后从di一孔、第二孔中各取100μl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50μl，混匀；然后在第三孔和第四孔中先各取50μl弃掉，再各取50μl分别取50μl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50μl，混匀后从第七、第八孔中加到第五、第六孔中，再在第五、第六孔中分别加标准品稀释液50ul，混匀；混匀后从第五、第六孔中各分别取50μl加到第九、第十孔中，再在第九第十孔分别加标准品稀释液50μl，混匀后从第九第十孔中各取50μl弃掉。（稀释后各孔加样量都为50μl，浓度分别为180 ng/L，120 ng/L ，60 ng/L，30 ng/，15 ng/L）。

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40μl，然后再加待测样品10μl（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. 温育：用封板膜封板后置37℃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50μl，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A50μl，再加入显色剂B50μl，轻轻震荡混匀，37℃避光显色15分钟.

10. 终止：每孔加终止液50μl，终止反应（此时蓝色立转黄色）。

11. 测定：以空白空调零，450nm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。

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。一次加样时间好控制在5 分钟内，如标本数量多，推荐使用排枪加样。

4. 封板膜只限一次性使用，以避免交叉污染。

5. 底物请避光保存。

6. 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.

7. 所有样品，洗涤液和各种废弃物都应按传染物处理。

8. 本试剂不同批号组分不得混用。

9.如需代测或者样本暂时不测定，可立即低温冻存，温度越低越好，中间避免反复冻融，-20℃以下可保存三个月,-70℃以下可保存六个月。

10.试剂使用须知：

11.（1）请参照相关法规、文献、MSDS等信息，理解并掌握好试剂的特性，再进行安全操作。

12.（2）通常购买试剂时一定要想到一次性用完。若估算不足有剩余的话，更加注意其他保管和管理。

13.（3）万一试剂操作者并非专业技术人员。必须在专业人士的指导监督下进行操作。对于使用后的废弃物，不要或者旧的试剂，应按照相关法律法规正当处理。

14.（4）购买后，请务必确认标签上的注意事项；做好预防颠倒，摔坏的措施和管理体制；在使用前再次确认标签上的注意事项，做好必要的安全对策；对没有标明其危害特性、有害特性的，也要慎重地进行操作；必须带好防护用具，小心翼翼进行操作。