



## 小鼠心钠肽 (ANP) ELISA 试剂盒

本试剂盒运用双抗体夹心 ELISA 法定量测定小鼠血清、血浆、组织匀浆、细胞裂解液、细胞培养上清液和其他生物液体中小鼠心钠肽 (ANP) 含量。

### 检测范围

7.813-500pg/mL

### 最低检测限

3.1pg/mL

### 实验原理

将小鼠心钠肽 (ANP) 抗体包被于 96 孔微孔板中，制成固相载体，向微孔中分别加入标准品或标本，其中的小鼠心钠肽 (ANP) 与连接于固相载体上的抗体结合，然后加入生物素化的小鼠心钠肽 (ANP) 抗体，将未结合的生物素化抗体洗净后，加入 HRP 标记的亲合素，再次彻底洗涤后加入 TMB 底物显色。TMB 在过氧化物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小鼠心钠肽 (ANP) 呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度 (O. D. 值)，计算样品浓度。

### 试剂盒内容

试剂名称	数量	试剂名称	数量
96 孔板 (预包被)	1	96 孔板覆膜	2
标准品	0.5ml × 1	标准品稀释液	1.5ml × 1 瓶
显色剂 A 液	6ml × 1 瓶	样品稀释液	6ml × 1 瓶
显色剂 B 液	6ml × 1 瓶	终止液	6ml × 1 瓶
酶标试剂	6ml × 1 瓶	密封袋	1
浓洗涤液 (30×)	1 × 20mL	使用说明书	1

### 小鼠心钠肽 (ANP) ELISA 试剂盒需自备的设备及试剂

1. 450 ± 10nm 滤光片的酶标仪 (建议仪器使用前提前预热)
2. 单道或多道微量加液器及吸头
3. 稀释样品的 EP 管
4. 蒸馏水或去离子水
5. 吸水纸



## 6. 盛放洗液的容器

### 试剂盒的储存及有效期

1. 未开封的试剂盒：所有试剂均按试剂瓶标签上所示保存。请注意，收到试剂盒后请尽快将 TMB 洗涤液，终止液保存于 4℃，其他试剂保存于-20℃。
2. 使用后的试剂盒：剩余试剂仍需按照试剂瓶标签所示的温度保存，开封后的酶标板要加干燥剂后密封保存于-20℃，避免潮湿。

#### 注意：

试剂盒内酶标条可拆卸，按实验需求可分多次使用；使用后的剩余试剂盒建议在首次实验后 1 个月内使用完毕。产品过期时间以盒子上的标签为准，保质期内所有组分都确保是稳定的。

### 小鼠心钠肽 (ANP) ELISA 试剂盒标本的采集与保存

#### 1. 血清：

将收集于血清分离管的全血标本在室温放置 2 小时或 4℃ 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标本，并将标本在采集后的 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：

- 1) 取适量组织块，于预冷 PBS (0.01mol/L, pH 7.0-7.2) 中清洗去除血液，称重后备用（组织块较大需先剪碎后再匀浆）；
- 2) 可同时选用多种匀浆方法达到较好的破碎效果：首先将组织块移入玻璃匀浆器，加入 5-10mL 预冷 PBS 进行充分研磨，该过程需在冰上进行（有条件实验室可选用机器匀浆）；得到的匀浆液可再利用超声破碎或反复冻融进一步处理（超声破碎过程中注意冰浴降温；反复冻融法可重复 2 次）。
- 3) 将制备好的匀浆液于 5000×g 离心 5 分钟，留取上清即可检测。

#### 4. 细胞裂解液：

- 1) 贴壁细胞需要先用胰酶消化，离心收集细胞（悬浮细胞可直接离心收集）；
- 2) 将收集到的细胞用冷 PBS 洗 3 次；
- 3) 物理方法裂解细胞（可先超声破碎细胞，再反复冻融）：
  - i 超声破碎：取适量 PBS 重悬细胞，用一定功率的超声波处理细胞悬液，使细胞急剧震荡破裂。
  - ii 反复冻融：将待破碎的细胞在-20℃ 以下冰冻，室温融解，反复 3 次，使细胞溶胀破碎。
- 4) 将标本于 2-8℃ 1500×g 离心 10 分钟，收集上清备用。

#### 5. 细胞培养上清或其它生物标本：

请 1000×g 离心 20 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。

#### 注意：

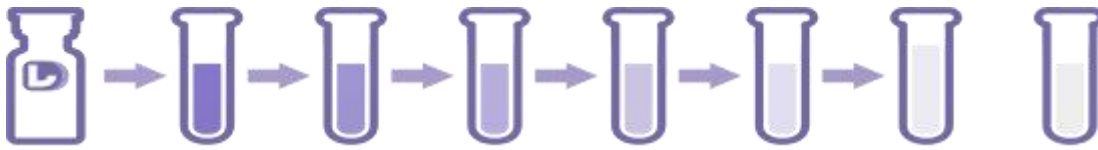
1. 以上标本均需密封保存，4℃ 保存应小于 1 周，-20℃ 不应超过 1 个月，-80℃ 不应超过 2 个月。
2. 标本使用前应缓慢均衡至室温，不应加热使之融解。



3. 实验前红细胞裂解液必须用标准品稀释液稀释。

## 小鼠心钠肽 (ANP) ELISA 试剂盒试剂准备

1. 使用前将所有的试剂和标本缓慢均衡至室温 (18-25°C)，试剂不能直接在 37°C 溶解。
2. 标准品 (冻干品)：每瓶标准品加入标准品稀释液 1mL，盖好后室温静置大约 10 分钟，同时反复颠倒/搓动以助溶解，其浓度为 500pg/mL。准备 7 个稀释标准品的 EP 管，每个 EP 管中加入 150  $\mu$ L 的标准品稀释液，如图所示依次倍比稀释成不同的梯度，标准品稀释液 (0pg/mL) 直接作为空白孔。为保证实验结果有效性，每次实验请使用新的标准品溶液。



3. 浓洗涤液：用 580mL 蒸馏水或去离子水将 20mL 浓洗涤液稀释至 600mL，进行 30 倍稀释。

## 标本处理

1. 本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用该试剂盒所造成的样本消耗负责，请使用者使用前充分考虑到样本的可能使用量，预留充足的样本。
2. 实验前应预测标本含量，如果标本浓度过高，应对标本进行稀释，使稀释后的标本符合试剂盒的检测范围，计算时再乘以相应的稀释倍数。
3. 若所检样本不包含在说明书所列样本之中，建议进行预实验验证其有效性，并注意留存样本。
4. 使用化学裂解液制备的组织匀浆或细胞提取液可能会由于某些化学物质的引入导致 ELISA 实验结果偏差。
5. 若样本为细胞培养上清，因该类样本干扰因素较多，如：细胞状态、细胞数量、采样时间等，所以可能存在检测不出的情况。
6. 某些天然蛋白或重组蛋白，包括原核及真核重组蛋白，可能因为与本产品所使用的检测抗体及捕获抗体不匹配，而不被检测出。
7. 建议使用新鲜样本，保存时间过长可能会存在蛋白降解或变性导致实验结果偏差。

## 小鼠心钠肽 (ANP) ELISA 试剂盒操作步骤

1. 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)、标准孔、待测样品孔。在酶标包被板上标准品准确加样 50  $\mu$ L，待测样品孔中先加样品稀释液 40  $\mu$ L，然后再加待测样品 10  $\mu$ L (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。
2. 温育：用封板膜封板后置 37°C 温育 30 分钟。
3. 配液：将 20 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 20 倍稀释后备用
4. 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。
5. 加酶：每孔加入酶标试剂 50  $\mu$ L，空白孔除外。
6. 温育：操作同 3。



7. 洗涤：操作同 5。
8. 显色：每孔先加入显色剂 A50  $\mu$  l，再加入显色剂 B50  $\mu$  l，轻轻震荡混匀，37 $^{\circ}$ C 避光显色 15 分钟。
9. 终止：每孔加终止液 50  $\mu$  l，终止反应（此时蓝色立转黄色）。
10. 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 分钟以内进行。

#### 注意：

1. **试剂准备：**准备一次实验所需要的酶标条，其它的可从微孔板上拆下，密封，按照说明书要求保存，以备下次使用。
2. **加样：**实验操作中请使用一次性的吸头，避免交叉污染。加样时注意不要有气泡，将样品加于酶标板底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀。加样或加试剂时，第一个孔与最后一个孔加样之间的时间间隔如果太大，将会导致不同的“预温育”时间，从而明显地影响到测量值的准确性及重复性。因此，一次加样时间（包括标准品及所有样品）最好控制在 10 分钟内。推荐设置复孔进行实验。
3. **温育：**为防止样品蒸发，实验时请将加上盖或覆膜的酶标板置于湿盒内，以避免液体蒸发，洗板后应尽快进行下步操作，任何时候都应避免酶标板处于干燥状态，同时应严格遵守给定的温育时间和温度。
4. **洗涤：**充分的洗涤非常重要，在每次洗涤过程中，都要将洗涤液完全甩干。洗涤过程中反应孔中残留的洗涤液应在滤纸上拍干，勿将滤纸直接放入反应孔中吸水，同时要消除板底残留的液体和手指印，避免影响最后的酶标仪读数。如果有自动洗板机，应在熟练使用后再用到正式实验过程中。
5. **反应时间的控制：**加入底物后请定时观察反应孔的颜色变化（比如，每隔 10 分钟观察一次），如颜色较深，请提前加入终止液终止反应，避免反应过强从而影响酶标仪光密度读数。
6. **底物：**底物请避光保存，在储存和温育时避免强光直接照射。
7. 如果实验室内湿度低于 60%，推荐使用加湿器提高湿度水平。

## 实验流程

1. 实验前标准品、试剂及样本的准备；
2. 加样（标准品及样本）50  $\mu$  L，37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟；
3. 洗板 5 次，加酶标试剂 50ul，37 $^{\circ}$ C 孵育半小时；
4. 洗板 5 次；加入显色液 A，B 各 50ul，37 $^{\circ}$ C 孵育显色 15 分钟
5. 加终止液 50  $\mu$  L，立即 450nm 读数。
6. 计算

## 小鼠心钠肽 (ANP) ELISA 试剂盒计算

各标准品及样本 O.D. 值扣除空白孔 O.D. 值后作图（七点图），如设置复孔，则应取其平均值计算。以标准品的浓度为纵坐标（或对数坐标），O.D. 值为横坐标（或对数坐标），绘出标准曲线（最佳方程式应依回归方程计算的 R2 值来定，以 R2 值越趋近于 1 为好）。推荐使用专业制作曲线软件进行分析，如 curve expert 1.30，根据样品 O.D. 值，由标准曲线查出相应的浓度，乘以稀释倍数；或用标准物的浓度与 O.D. 值计算出标准曲线的回归方程式，将样品的 O.D. 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。

## 特异性

本试剂盒用于检测小鼠心钠肽 (ANP)，经检测与其它相似物质无明显交叉反应。



由于受到技术及样本来源的限制，不可能完成对所有相关或相似物质交叉反应检测，因此本试剂盒有可能与未经检测的其它物质有交叉反应。

## 精密度

精密度用样品测定值的变异系数 CV 表示。 $CV(\%) = SD/\text{mean} \times 100$

批内差：取同批次试剂盒对低、中、高值定值样本进行定量检测，每份样本连续测定 20 次，分别计算不同浓度样本的平均值及 SD 值。

批间差：选取 3 个不同批次的试剂盒分别对低、中、高值定值样本进行定量测定，每个样本使用同一试剂盒重复测定 8 次，分别计算不同浓度样本的平均值及 SD 值。

批内差： CV<10%

批间差： CV<12%

## 小鼠心钠肽 (ANP) ELISA 试剂盒稳定性

经测定，试剂盒在有效期内按推荐温度保存，其活性降低率小于 5%。

为减小外部因素对试剂盒破坏前后检测值的影响，实验室的环境条件需尽量保持一致，尤其是实验室内温度、湿度及温育条件。其次由同一实验员来进行操作可减少人为误差。