**血小板激活因子乙酰水解酶Ⅰb3elisa方法说明书**

**试剂盒组成 :**

1、30倍浓缩洗涤液 20ml×1瓶 7 终止液 6ml×1瓶

2、酶标试剂 6ml×1瓶 8 标准品（160pg/ml） 0.5ml×1瓶

3、酶标包被板 12孔×8条 9 标准品稀释液 1.5ml×1瓶

4、样品稀释液 6ml×1瓶 10 说明书 1份

5、显色剂A液 6ml×1瓶 11 封板膜 2张

6、显色剂B液 6ml×1/瓶 12 密封袋 1个

**实验原理:**

本试剂盒应用双抗体夹心法测定标本中血清素/血清胺(ST)水平。用纯化的血清素/血清胺(ST)抗体包被微孔板，制成固相抗体，往包被单抗的微孔中依次加入血清素/血清胺(ST)，再与HRP标记的血清素/血清胺(ST)抗体结合，形成抗体-抗原-酶标抗体复合物，经过彻di洗涤后加底物TMB显色。TMB在HRP酶S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血清素/血清胺(ST)呈正相关。用酶标仪在450nm波长下测定吸光度（OD值），通过标准曲线计算样品中血清素/血清胺(ST)浓度。

**试剂盒性能：**

1. 灵敏度：最小的检测浓度小于1号标准品。稀释度的线性。样品线性回归与预期浓度相关系数R值为0.990。

2. 特异性：不与其它细胞因子反应。

3. 重复性：板内、板间变异系数均小于10%。

**试剂盒**特点:****

1、高效、灵敏、特异的抗体;

2、稳定的重复性和可靠性;

3、吸附性能好，空白值低，孔底透明度高的固相载体;

4、适用血清、血浆、组织匀浆液、细胞培养上清液、尿液等等多种标本类型;

5、节省实验经费。

**标本要求:**

1．标本采集后尽早进行提取，提取按相关文献进行，提取后应尽快进行实验。若不能马上进行试验，可将标本放于-20℃保存，但应避免反复冻融

2．不能检测含NaN3的样品，因NaN3抑制辣根过氧化物酶的（HRP）活性。

**样本处理及要求：**

1.血清：全血标本请于室温放置2小时或4℃过夜后于1000g离心20分钟，取上清即可检测，或将标本放于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。

2.血浆：可用EDTA或肝素作为抗凝剂，标本采集后30分钟内于2 - 8°C 1000g离心20分钟，或将标本放于-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测量结果），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。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。将匀浆液于5000×g离心5~10分钟，取上清检测。

4.细胞培养物上清或其它生物标本：1000g离心20分钟，取上清即可检测，或将标本放于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。

**操作步骤：**

1.标准品的稀释：本试剂盒提供原倍标准品一支，用户可按照下列图表在小试管中进行稀释。



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）、标准孔、待测样品孔。在酶标包被板上标准品准确加样50μl，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倍浓缩洗涤液用蒸馏水30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10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：以空白孔调零，450nm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。

**计算：**

  以标准物的浓度为横坐标，OD值为纵坐标，在坐标纸上绘出标准曲线，根据样品的OD值由标准曲线查出相应的浓度；再乘以稀释倍数；或用标准物的浓度与OD值计算出标准曲线的直线回归方程式，将样品的OD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。

**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（×n×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。