

脂多糖 (LPS) 定量检测试剂盒 (竞争法)

【产品介绍】

本试剂盒采用酶联免疫分析方法。采用生物素标记LPS，纯化的抗LPS抗体包被微孔板，在竞争抑制反应中，一定量的固相抗体与生物素标记LPS及非标记抗原（校准品或标本）进行抑制竞争反应，抗体与生物素标记的LPS结合量受非标记抗原量所抑制，非标记抗原量多，抗体与生物素标记的LPS结合就少，反之结合就多；反应平衡后，形成固相抗体-生物素化LPS，再加入酶标记的亲合素，形成固相抗体-生物素化LPS-酶标-亲合素复合物。经加底物显色后，用酶标仪在450nm波长下测定吸光度（OD值）。随着LPS浓度的升高，OD值逐渐下降呈良好的线性关系。本试剂盒具有灵敏度高、特异性强、重复性好、操作简单、快速等特点，对血清中LPS的减少或升高有可靠的检出性能。

【产品组分】

组分	数量	主要成分
校准品	0.5mL*6管	抗原配制的6个浓度标准品
包被微孔板	96T	预包被固相抗体
HRP 标记抗体	6mL	HRP标记的检测抗体
生物素化抗原	6mL	检测抗原
底物A	6mL	过氧化脲工作液
底物B	6mL	TMB工作液
终止液	6mL	2mol/L稀释液
20×洗涤缓冲液	30mL	含0.15%Tween20的PBS
封板膜	1份	--
说明书	1个	--
自封袋	2片	--

备注：

- 1.标准品浓度依次为：32、16、8、4、2、0 EU/L
- 2.本品必须按照具有潜在的感染性进行处理，处理过程应当遵循通用的安全措施。

【技术提示】

- 1.混合蛋白溶液时，避免起泡。
- 2.加校准品与样本时，每个校准品浓度和样本都要更换移液枪头，公共组分应该悬臂加样，避免交叉污染。
- 3.合适的温育时间，和充分的洗涤步骤，是保证实验结果准确性的必要条件。
- 4.使用自动洗板机时，加入一个30秒浸泡的步骤，可以提高检测精度。
- 5.底物溶液为无色液体，保存过程中变为蓝色，代表底物溶液已经失效，不得使用。
- 6.终止液加样顺序与底物溶液加样顺序一致，加入终止液后，蓝色底物产物，会瞬间变为黄色。
- 7.实验中，用剩的板条，应立即放回自封袋中，密封（低温干燥）保存。
- 8.所有液体组分，使用前充分摇匀，严格按照说明书标明的时间、加样量及加样顺序进行温育操作。

【保存条件和稳定性】

样本在2-8℃条件下，可以储存72h，或者在-20℃储存6个月。样本收集后，不是一次检测完，请按一次用量分装冻存，避免反复冻融，使用时在室温下解冻，确保样品均匀充分解冻。

样本类型及采集

以下只是列出样品采集的一般指南。所有样本采集过程中，不得使用叠氮钠做为防腐剂。

【血清】

使用不含热原和内毒素的试管，操作过程中避免任何细胞刺激，4000rpm条件下离心20min，小心地分离出血清，保存在-20℃以下，应避免反复冻融。

【血浆】

肝素，EDTA，或柠檬酸钠作为抗凝剂。在4000rpm条件下，离心20分钟取上清，血浆保存在-20℃以下，应避免反复冻融。

【组织】

用预冷的PBS(0.01 M,pH=7.4)冲洗组织，去除残留血液，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9 mL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，在冰上充分研磨。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。最后将匀浆液 $5000\times g$ 离心5-10分钟，取上清检测。

【细胞培养物上清】

4000rpm条件下离心20min，去除细胞颗粒和聚合物，上清液保存在 -20°C 以下，应避免反复冻融。

【其他用品】

- ✓酶标仪(450nm)
- ✓精密移液器及一次性吸头
- ✓ 37°C 水浴锅或恒温箱
- ✓蒸馏水
- ✓洗瓶或者自动洗板机
- ✓500ml量筒

【实验步骤】

- 1.将各种试剂移至室温平衡两小时，取浓缩洗涤液，根据当批检测数量，用蒸馏水1:20稀释，混匀后备用。
- 2.将预包被板从密封袋中取出，设一个空白对照孔，不加任何液体；每个校准品设2孔，每孔加入对应校准品 $50\mu\text{l}$ ；其余每个检测孔直接加待测血清或质控品 $50\mu\text{l}$ 。

- 3.除空白孔外所有孔加入生物素化抗原50 μ l，混匀，贴上封板膜，置37 $^{\circ}$ C温育60分钟。
 - 4.手工洗板：弃去孔内液体，洗涤液注满各孔，静置10秒甩干，重复3次后拍干。洗板机洗板：选择洗涤3次程序洗板后拍干。
 - 5.每孔加入酶标亲合素50 μ l（空白对照孔除外），混匀，贴上封板膜，置37 $^{\circ}$ C温育30分钟。
 - 6.手工洗板：弃去孔内液体，洗涤液注满各孔，静置10秒甩干，重复3次后拍干。洗板机洗板：选择洗涤3次程序洗板后拍干。
 - 7.每孔加显色剂A 50 μ l，显色剂B 50 μ l，振荡混匀后，置37 $^{\circ}$ C避光显色15分钟，每孔加终止液50 μ l。
- 用酶标仪读数，取波长450nm，先用空白对照孔调零点，然后测定各孔光密度值（OD值）。

【实验结果计算】

检测完成后，以标准品浓度做为纵坐标，对应的吸光度（OD值）作为横坐标，利用计算机软件，采用四参数Logistic曲线拟合（4-pl），创建标准曲线方程，通过样本的吸光度（OD值），利用方程计算样品的浓度。

如果样品被稀释，通过上述方法测得的浓度值，要乘以稀释倍数，才是样品的最终浓度。

【试剂盒性能指标】

1.物理性能

外观和物理检查：液体组分应澄清，无沉淀或絮状物；所有组分应无包装破损。各组分装量不少于组分表中要求。

2.剂量反应曲线线性

用四参数Logistic曲线拟合（4-pl），剂量-反应曲线相关系数（r）的绝对值应不低于0.9900。

3.精密度

批内精密度：三组已知的高、中、低浓度样品，进行二十次在同一个板块内精度评估。批内变异系数CV%小于15%。

批间精密度：三组已知的高、中、低浓度样品，进行二十次在不同板块内精度评估。批间变异系数CV%小于15%。

4.灵敏度

最低检出限：应不高于0.1 EU/L。

5.回收率

三组已知的高、中、低浓度样品，进行五次在同一个板块内回收率评估，回收率在85%-115%之间。

6.稳定性

2°C-8°C 保存，有效期6个月。

7.检测范围

2-32 EU/L。

【特殊情况说明】

在试剂盒标示的有效期内使用，过期产品不得使用。

跟其他厂家的试剂盒或者组分不能混用。

样品需要稀释的话可以用PBS (PH7.4)稀释。

如果样本值高于最高标准品浓度值，请将样本适当稀释后，再重新测定。

待测样本中可能存在的异嗜抗体会干扰检测结果，检测前，请排出该因素。

通过其他方法得到的检测结果，与本试剂盒测定结果不具有直接的可比性。

【注意事项】

为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

本产品仅供研究使用，不可用于人或动物的体外诊断与治疗。

For laboratory use only. Not for diagnostic or therapeutic use.