



E91127Bo 96T

脱氧核糖核酸酶 I (DNase I)

酶联免疫吸附测定试剂盒 (ELISA Kit)

适用生物：牛

使用说明书

仅供体外研究使用，不用于临床诊断！

第 7 版（2011 年 11 月修订）

[预期应用]

本试剂盒运用双抗体夹心 ELISA 法定量测定牛血清、血浆或其它相关生物液体中 DNase I 含量。

[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	4
标准品(冻干)	2	标准品稀释液	1×20mL
检测溶液A(绿色)	1×120 μ L	检测稀释液A(2×)	1×6mL
检测溶液B(红色)	1×120 μ L	检测稀释液B(2×)	1×6mL
TMB底物	1×9mL	终止液	1×6mL
浓洗涤液(30×)	1×20mL	使用说明书	1

[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标准品、检测溶液 A、检测溶液 B 以及 96 孔板保存于-20℃。有效期为 6 个月。
- 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。

[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。

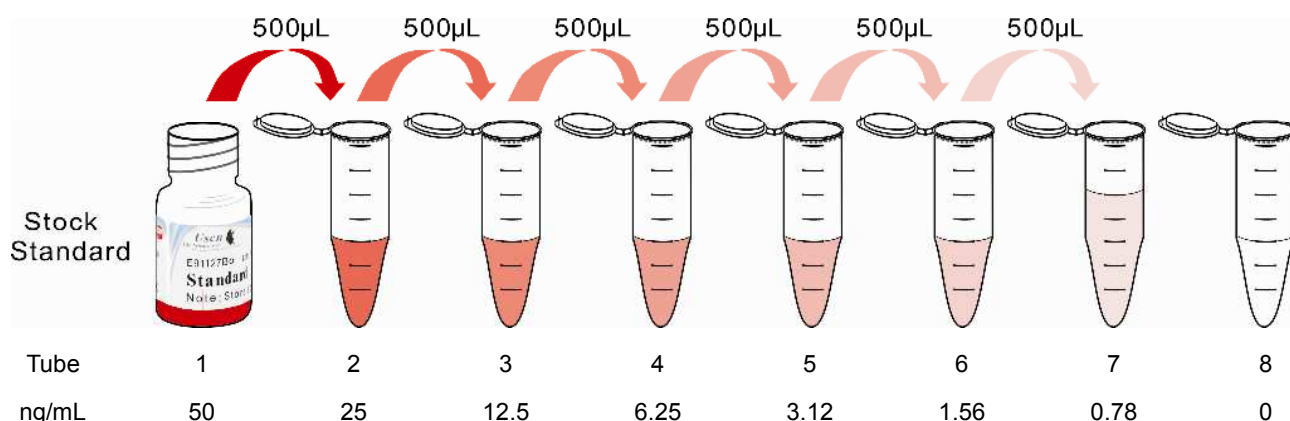
- 2、血浆：用 EDTA 或肝素作为抗凝剂采集标本，并将标本在采集后的 30 分钟内于 2-8℃ 1000×g 离心 15 分钟，取上清即可检测，或将上清置于-20℃ 或-80℃ 保存，但应避免反复冻融。
- 3、其它生物标本：请 1000×g 离心 20 分钟，取上清即可检测，或将上清置于-20℃ 或-80℃ 保存，但应避免反复冻融。

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、标本溶血会影响最后检测结果，因此溶血标本不宜进行此项检测。
- 3、标本使用前应缓慢均衡至室温，不应加热使之融解。

[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℃)，试剂不能直接在 37℃ 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 50ng/mL。准备 7 个稀释标准品的 EP 管，每个 EP 管中加入 500 μL 的**标准品稀释液**，如图所示依次倍比稀释成 50ng/mL，25ng/mL，12.5ng/mL，6.25ng/mL，3.12ng/mL，1.56ng/mL，0.78ng/mL，标准品稀释液(0ng/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、**检测稀释液 A 及检测稀释液 B**：用 6mL 蒸馏水或去离子水将 6mL 浓检测液 A 及 B 稀释至 12mL，进行 2 倍稀释，稀释后的工作液不宜进行冷冻保存。**(考虑到实验过程中的试剂损失，试剂瓶中稀释液的量多于 6mL，因此在每次实验中，必须用移液器准确吸取实验所需量，并在新的容器中进行倍比稀释。)**
- 4、**检测溶液 A 及检测溶液 B**：Detection A 及 Detection B 在使用前请手甩几下或少时离心处理，以使管壁或瓶盖的液体沉积到管底。临用前分别以**检测稀释液 A 或 B**1:100 稀释(如：10 μL 检测溶液 A/990 μL 检测稀释液 A)，充分混匀，稀释前根据预先计算好的每次实验所需的总量配制(100 μL/孔)，实际配制时应多配制 0.1-0.2mL。
- 5、**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。
- 6、**底物溶液**：请用灭菌的移液器吸头吸取所需体积的 TMB 至另一干净容器中使用，容器中剩余的底物应予丢弃，不要倒回 TMB 瓶中。

注意：

- 1、标准品的稀释不能直接在板中进行。
- 2、**标准品**请于临用前 15 分钟内配制。**该标准品只能使用一次。**
- 3、**标准品、检测溶液 A 工作液、检测溶液 B 工作液**请使用相应的稀释液配制，不能混淆。混匀时要轻轻充分混匀，避免起泡。为保证实验结果的准确请使用微量吸管，并校准微量加液器。请依据所需的量精确配制，尽量不要微量配制(如吸取**检测溶液 A**时，一次不要小于 10 μL)，以避免造成浓度误差。
- 4、请勿重复使用已经稀释过的**标准品、检测溶液 A 工作液**和**检测溶液 B 工作液**。
- 5、**浓洗涤液**中如有结晶析出，请先温育至室温，轻轻混匀，至到结晶完全溶解再进行配制。

- 6、试剂盒中部分试剂为储存液，客户需配置成工作液后使用，在配置过程中如因纯净水质量差或水质污染，以及实验中所用耗材洁净度差，可能造成实验结果不准确，甚至完全错误，请使用双蒸水。

[标本处理]

- 1、**Uscn, Inc. 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、血清或血浆标本推荐稀释大约 20 倍，如：稀释 20 倍，取 20 μ L 血清或血浆加入 380 μ L PBS。标本使用 0.02mol/L 的 PBS 稀释(PH=7.0-7.2)。
- 4、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。
- 5、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。
- 6、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。
- 7、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。
- 8、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。

[操作步骤]

- 1、加样：分别设标准孔、待测样品孔、空白孔。设标准孔 7 孔，依次加入 100 μ L 不同浓度的标准品(见试剂准备 2)。空白孔加 100 μ L(见试剂准备第二步最后一管)，余孔加待测样品 100 μ L，酶标板加上覆膜，37°C 温育 2 小时。
- 2、弃去液体，甩干，不用洗涤。
- 3、每孔加**检测溶液 A 工作液** 100 μ L(临用前配制)，酶标板加上覆膜，37°C 温育 1 小时。
- 4、弃去孔内液体，每孔用 350 μ L 的洗涤液洗涤，浸泡 1-2 分钟，吸去(不可触及板壁)或甩掉酶标板内的液体，在实验台上铺垫几层吸水纸，酶标板朝下用力拍几次(也可轻拍将孔内液体拍干)，重复洗板 3 次。最后一次洗涤后，要把孔内的洗涤液完全甩干。自动洗板机亦可。
- 5、每孔加**检测溶液 B 工作液**(临用前配制)100 μ L，加上覆膜，37°C 温育 30 分钟。
- 6、弃去孔内液体，甩干，洗板 5 次，方法同步骤 4。
- 7、每孔加**底物溶液** 90 μ L，酶标板加上覆膜，37°C **避光显色**(反应时间控制在 15-25 分钟，不要超过 30 分钟。当标准孔的前 3-4 孔有明显的梯度蓝色，后 3-4 孔梯度不明显时，即可终止)。
- 8、每孔加**终止溶液** 50 μ L，终止反应，此时蓝色立转黄色。终止液的加入顺序应尽量与底物溶液的加入顺序相同。如出现颜色不匀一，请轻轻晃动酶标板以使溶液混合均匀。
- 9、在确保酶标板底无水滴及孔内无气泡后，立即用酶标仪在 450nm 波长测量各孔的光密度(O. D. 值)。

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。

[实验原理]

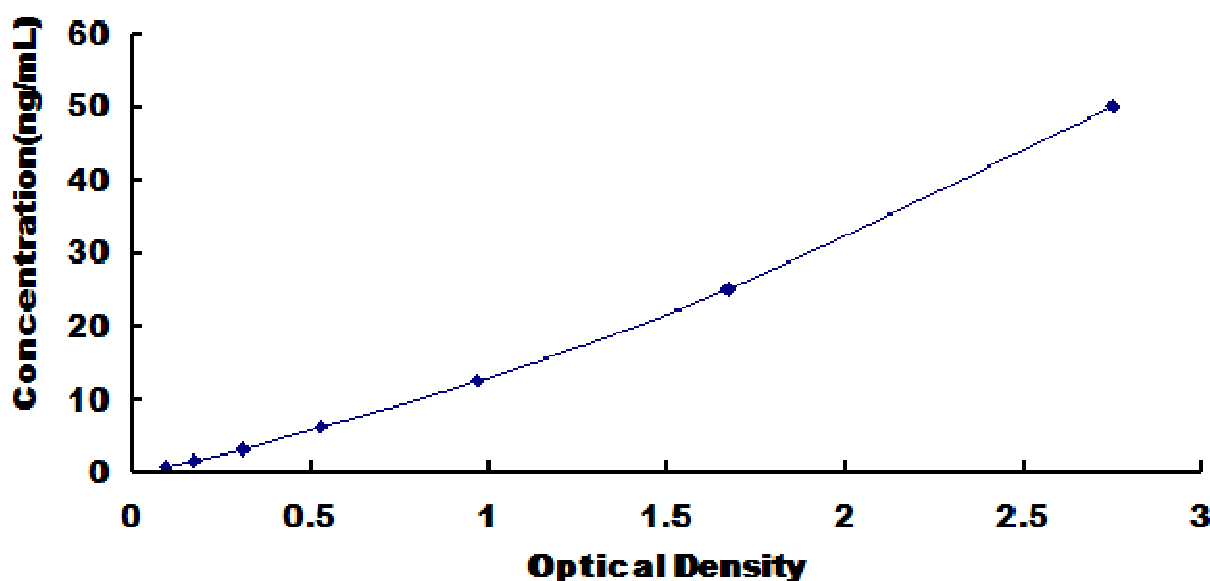
将 DNase I 抗体包被于 96 孔微孔板中，制成固相载体，向微孔中分别加入标准品或标本，其中的 DNase I 与连接于固相载体上的单克隆抗体结合，然后加入生物素化的多克隆 DNase I 抗体，将未结合的生物素化抗体洗净后，加入 HRP 标记的亲合素，再次彻底洗涤后加入 TMB 底物显色。TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色，并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的 DNase I 呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度 (O.D. 值)，计算样品浓度。

[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 R^2 值来定，以 R^2 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。

[典型数据]

为了便于计算，尽管浓度为自变量而 O.D. 值为因变量，我们绘图时仍采用标准品的 O.D. 值作为横坐标(X 轴)，标准品的浓度为纵坐标(Y 轴)。同时为了试验结果的直观性，图中提供的是原始数据而非对数值。推荐使用对数值建立标准曲线图。由于实验操作条件的不同（如操作者、移液技术、洗板技术和温度条件等），标准曲线的 O.D. 值会有所差异。所提供的标准曲线仅供参考，实验者需要根据自己的实验建立标准曲线。



牛脱氧核糖核酸酶 I (DNase I) 试剂盒标准曲线