人铜绿假单胞菌外毒素A（PEA）试剂盒（ELISA）

使用说明书

本试剂盒用于体外定性检测血清、血浆、组织匀浆及相关液体样本中人铜绿假单胞菌外毒素A（PEA）。

有效期：6个月

保存条件：2-8℃

实验原理

试剂盒采用双抗体夹心法酶联免疫吸附试验（ELISA）。往预先包被人铜绿假单胞菌外毒素A（PEA）捕获抗体的包被微孔中，依次加入标本、阴性和阳性对照、HRP标记的检测抗体，经过温育并彻底洗涤。用底物TMB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人铜绿假单胞菌外毒素A（PEA）呈正相关。用酶标仪在450nm波长下测定吸光度（OD 值），判定阴阳性。

样本处理及要求

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：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。最后将匀浆液于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：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：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。

需要而未提供的试剂和器材

1、酶标仪（450nm）

2、高精度加样器及枪头：0.5-10uL、2-20uL、20-200uL、200-1000uL

3、37℃恒温箱

4、蒸馏水或去离子水

试剂盒组成

名称	**96** 孔配置	**48** 孔配置	备注
微孔酶标板	96 孔	48 孔	无
阴性对照	0.3mL	0.3mL	无
阳性对照	0.3mL	0.3mL	无
样本稀释液	6mL	3mL	无
检测抗体-HRP	10mL	5mL	无
20×洗涤缓冲液	25mL	15mL	按说明书进行稀释
底物 A	6mL	3mL	无
底物 B	6mL	3mL	无
终止液	6mL	3mL	无
封板膜	2 张	2 张	无
说明书	1 份	1 份	无
自封袋	1 个	1 个	无

注意事项

1、严格按照规定的时间和温度进行温育以保证准确结果。所有试剂都必须在使用前达到室温 20-25℃ 。使用后立即冷藏保存试剂。

2、洗板不正确可以导致不准确的结果。在加入底物前确保尽量吸干孔内液体。温育过程中不要让微孔干燥掉。

3、消除板底残留的液体和手指印，否则影响 OD 值。

4、底物显色液应呈无色或很浅的颜色，已经变蓝的底物液不能使用。

5、避免试剂和标本的交叉污染以免造成错误结果。

6、在储存和温育时避免强光直接照射。

7、平衡至室温后再打开密封袋以防水滴凝聚在冷板条上。

8、任何反应试剂不能接触漂白溶剂或漂白溶剂所散发的强烈气体。任何漂白成分都会破坏试剂盒中反应试剂的生物活性。

9、不能使用过期产品。

10、如果可能传播疾病，所有的样品都应管理好，按照规定的程序处理样品和检测装置。

试剂准备

1、试剂盒从冷藏环境中取出应在室温平衡后方可使用。

2、20×洗涤缓冲液的稀释：蒸馏水按1：20稀释，即1份20×洗涤缓冲液加19份蒸馏水。

操作步骤

从室温平衡 20min 后的铝箔袋中取出所需板条，剩余板条用自封袋密封放回4℃。

2、 设置阴性对照孔、阳性对照孔和样本孔，阴性、阳性对照孔各加 50μL 对照品，样本孔中加入待测样本 50μL，空白孔不加。

3、 除空白孔外，对照孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的检测抗体 100μL，用封板膜封住反应孔，37℃水浴锅或恒温箱温育 60min。

4、 弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液（350μL），静置 1min，甩去洗

涤液，吸水纸上拍干，如此重复洗板 5 次（也可用洗板机洗板）。

5、 每孔加入底物 A、B 各 50μL，37℃避光孵育 15min。

6、 每孔加入终止液 50μL，15min 内，在 450nm 波长处测定各孔的 OD 值。

实验结果计算

1、阴性对照OD值：小于0.2。

2、阳性对照OD值：大于0.8。

3、阳性判断（Cut-Off值）：阴性对照OD值+0.25，样本OD值大于阈值，判定为阳性，反之，为阴性。

4、重复性：板内变异系数小于15%。

5、储藏：2-8℃避光密封保存。

［说明］

1、由于现有条件及科学技术水平尚不能对供货商提供的所有所有原料进行全面的鉴定与分析，本产品可能存在一定的质量技术风险。

2、最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境密切相关，请务必准备充足的标本备份。

3、不同批次的同一产品可能会有少许差别，网站电子版说明书仅作参考。

4、本试剂盒配套试剂必须配套使用，不能混用其他制造商的产品。只有严格遵守本试剂盒的实验说明才会得到最佳的检测结果。

5、用于制备试剂盒中抗体的免疫原通常为重组蛋白，但由于备重组蛋白所选取的片段、表达系统、纯化方式等各有不同，所以我们无法保证该试剂盒可用于其他公司重组蛋白的检测，通常我们也不建议使用试剂盒检测重组蛋白。

6、该试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。

7、本试剂盒中使用了稀硫酸作为终止液，其具有轻微腐蚀性，使用时应避免接触衣物或眼、手等皮肤暴露部位。