仅供科研使用，不得用于临床诊断

植物维生素 C（VC）定量检测试剂盒（ELISA）

定量检测植物组织、细胞培养上清液中植物 维生素 C（VC）的含量。

使用试剂盒前，必须仔细阅读本说明书。

实验原理

本试剂盒采用竞争法酶联免疫吸附试验（ELISA）。在预包被抗维生素 C（VC）抗体（固相抗体）的微孔酶标板中，加入植物维生素 C（VC）校准品和待测样本，再加入 HRP 标记的植物维生素 C（VC）抗原（酶标抗原），经过温育与充分洗涤，去除未结合的组分，在微孔板固相表面形成固相抗体-酶标抗原的免疫复合物。加底物 A 和 B，底物在 HRP 催化下，产生蓝色产物，在终止液（2M 硫酸）作用下，最终转化为黄色，在酶标仪 450nm 波长上测定吸光度（OD 值），吸光度（OD 值）与待测样品中维生素 C（VC）的浓度负相关。拟合校准品曲线，可以计算出样本中植物维生素 C（VC）的浓度。

试剂盒限制性

1、 仅供科研使用，不得用于临床诊断。

2、 在试剂盒标示的有效期内使用，过期产品不得使用。

3、 跟其他厂家的试剂盒或者组分不能混用。

4、 样品需要稀释的话可以用 PBS（PH7.4)稀释。

5、 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。

6、 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。

7、 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。

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。

试剂盒组分与保存

未开封的试剂盒保存在 2-8 度，不得使用过期试剂盒。

组分	数量	主要成分	开封后储存
校准品	0.35ml/管	--	2-8℃14 天
包被微孔板	96T/48T	预包被固相抗体	2-8℃14 天
HRP 标记抗原	10mL	HRP 标记的检测抗原	2-8℃180 天
底物液 A	6mL	0.01%过氧化氢	2-8℃180 天
底物液 B	6mL	0.1%TMB	2-8℃180 天
终止液	6mL	2mol/L 稀硫酸	2-8℃180 天
20×浓缩洗涤液	25mL	0.05%Tween20	2-8℃180 天
说明书	1 份	--	--
自封袋	1 个	--	--
不干胶	2 片	--	--

校准品浓度依次为 80、40、20、10、5、0μmol/L。

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。

其他用品

1、 酶标仪（450nm）

2、 精密移液器及一次性吸头

3、 蒸馏水

4、 洗瓶或者自动洗板机

5、 37℃水浴锅或恒温箱

6、 500ml 量筒

生物安全

1、检测必须符合实验室管理规范的规定，严格防止交叉污染，所有样品、洗弃液和各种废弃物都应按照传染物进行处置。

2、试剂盒的液体组分中，含有 proclin-300 防腐剂，可能引起皮肤过敏反应，避免吸入烟雾与皮肤接触。

3、底物液对皮肤、眼睛和上呼吸道有刺激作用，避免吸入烟雾。

4、戴上防护手套，实验完成后彻底洗手。

样品的采集和储存

样本类型和采集

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。

植物标本中相关酶或蛋白的测定：

1、 新鲜植物组织请在液氮中充分研磨；

2、 加入样品体积 9 倍的提取液（pH 7.4 PBS 缓冲液）；

3、 请于 4 度，8000rpm，离心 30 分钟，取上清并暂时保存于 4 度待用。

植物细胞：

用 PH7.2-7.4 的 PBS 稀释细胞悬液，使细胞浓度达到 100 万/ml 左右，置于冰盒上，用超声破碎仪，设置破碎 2s，冷却 30s 的方式，充分破碎细胞，以使细胞破坏并放出细胞内成份。2-8℃条件离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分），仔细收集上清，保存过程中如有沉淀形成，应再次离心。

样本保存和稳定性

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。20×浓缩洗涤液要稀释成 1x 后使用（1 份 20x 的浓缩洗涤液加入 19 份蒸馏水稀释）。

检验方法

操作程序

所有试剂和组分都先恢复到室温，标准品、质控品和样品，建议做复孔。

1. 按前面说明书描述的方法，配制好试剂盒各种组分的工作液。
2. 从铝箔袋中取出所需板条，剩余的板条用自封袋密封放回冰箱。设置标准品孔、空白孔和样本孔，标准品孔各加不同浓度的标准品 50μL，空白孔不加，样本孔加待测样本 50μL。
3. 除空白孔外，标准品孔和样本孔，加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的检测抗原 100μL。
4. 用封板膜盖住反应板，37℃水浴锅或恒温箱温育 60min。
5. 揭开封板膜，弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液，静置 20S，甩去洗涤液，吸水纸上拍干，如此重复 5 次。若使用自动洗板机，请按洗板机操作程序进行洗板，添加浸泡 30s 的程序，可以提高检测的精度。洗板结束，加底物前，要在干净不掉屑的纸上，充分拍干反应板。
6. 将底物 A 和 B 按 1:1 体积充分混合，所有孔中加入底物混合液 100μL。用封板膜盖住反

应板，37℃水浴锅或恒温箱温育 15min。

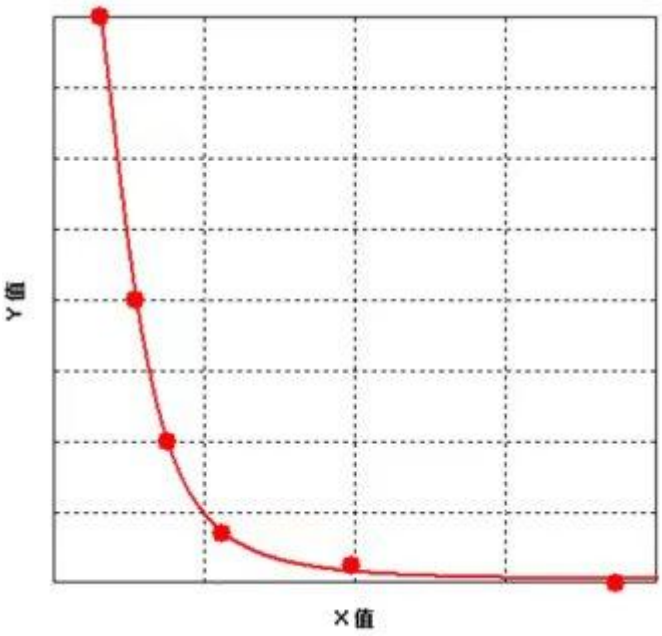
7. 所有孔加入终止液 50μL，在酶标仪上读取各孔吸光度（OD 值）。

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）。

结果计算

检测完成后，以标准品浓度做为横坐标，对应的吸光度（OD 值）作为纵坐标，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值。

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



（示意图，仅供参考）

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 0.1μmol/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℃-8℃保存，有效期 6 个月。

7、检测范围

2.5 μmol/L – 80 μmol/L