仅供科研使用，不得用于临床诊断

植物褪黑素（MT）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 褪黑素（MT）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）。在预包被抗褪黑素（MT）抗体（固相抗体）的微孔酶标板中，加入植物褪黑素（MT）校准品和待测样本，再加入 HRP 标记的植物褪黑素（MT）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）与待测样品中褪黑素（MT）的浓度负相关。拟合校准品曲线，可以计算出样本中植物褪黑素（MT）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 16、8、4、2、1、0pg/mL。

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。

仅供科研使用，不得用于临床诊断。

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。

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。

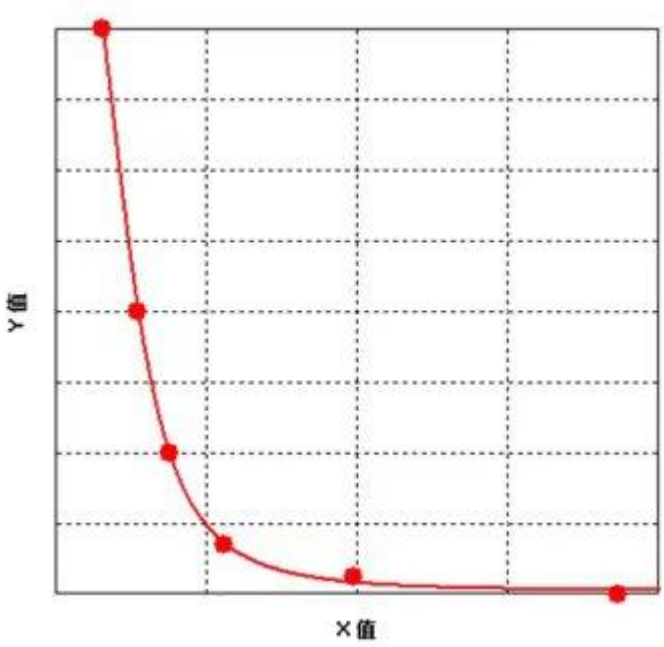
6. 将底物 A 和 B 按 1:1 体积充分混合，所有孔中加入底物混合液 100μL。用封板膜盖住反应板，37℃水浴锅或恒温箱温育 15min。
7. 所有孔加入终止液 50μL，在酶标仪上读取各孔吸光度（OD 值）。

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 0.1pg/mL。

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

0.5 pg/mL - 16 pg/mL