

植物葡萄糖焦磷酸化酶 (AGPase) 酶联免疫分析 (ELISA)

试剂盒使用说明书

本试剂仅供研究使用 **目的: 本试剂盒用于测定植物组织、细胞及相关液体样本中葡萄糖焦磷酸化酶 (AGPase) 的活性。**

实验原理:

本试剂盒应用双抗体夹心法测定标本中植物葡萄糖焦磷酸化酶 (AGPase) 水平。用纯化的植物葡萄糖焦磷酸化酶 (AGPase) 捕获抗体包被微孔板, 制成固相抗体, 往包被的微孔中依次加入植物葡萄糖焦磷酸化酶 (AGPase), 再与 HRP 标记的检测抗体结合, 形成抗体-抗原-酶标抗体复合物, 经过彻底洗涤后加底物 TMB 显色。TMB 在 HRP 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植物葡萄糖焦磷酸化酶 (AGPase) 呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度 (OD 值), 通过标准曲线计算样品中植物葡萄糖焦磷酸化酶 (AGPase) 活性。

试剂盒组成:

试剂盒组成	48 孔配置	96 孔配置	保存
说明书	1 份	1 份	
封板膜	2 片	2 片	
密封袋	1 个	1 个	
酶标包被板	1×48	1×96	2-8℃ 保存
标准品	0.3ml×6 管	0.3ml×6 管	2-8℃ 保存
酶标试剂	5 ml×1 瓶	10 ml×1 瓶	2-8℃ 保存
样品稀释液	3 ml×1 瓶	6 ml×1 瓶	2-8℃ 保存
显色剂 A 液	3 ml×1 瓶	6 ml×1 瓶	2-8℃ 保存
显色剂 B 液	3 ml×1 瓶	6 ml×1 瓶	2-8℃ 保存
终止液	3 ml×1 瓶	6 ml×1 瓶	2-8℃ 保存
20×浓缩洗涤液	15ml×1 瓶	25ml×1 瓶	2-8℃ 保存

注: 标准品浓度依次为: 400、200、100、50、25、0 U/L。

样本处理及要求:

1. 植物标本中相关酶或蛋白的测定: 新鲜植物组织请在液氮中充分研磨; 加入样品体积 9 倍的提取液 (pH 7.4 PBS 缓冲液), 请于 4 度, 8000rpm, 离心 30 分钟, 取上清并暂时保存于 4 度待用。
2. 细胞培养上清: 检测分泌性的成份时, 用无菌管收集。离心 20 分钟左右 (2000-3000 转/分)。仔细收集上清。检测细胞内的成份时, 用 PBS (pH7.2-7.4) 稀释细胞悬液, 细胞浓度达到 100 万/ml 左右。通过反复冻融, 以使细胞破坏并放出细胞内成份。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。
3. 标本采集后尽早进行提取, 提取按相关文献进行, 提取后应尽快进行实验。若不能马上

进行试验, 可将标本放于-20℃保存, 但应避免反复冻融.

4. 不能检测含 NaN₃ 的样品, 因 NaN₃ 抑制辣根过氧化物酶的 (HRP) 活性。

操作步骤:

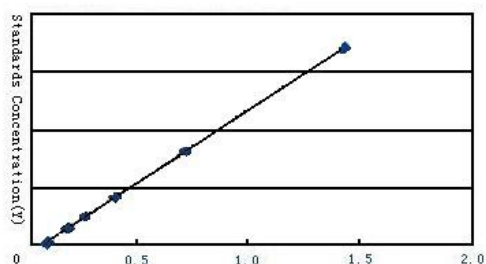
1. 标准品的加样: 设置标准品孔和样本孔, 标准品孔各加不同浓度的标准品 50 μL;。
2. 加样: 分别设空白孔 (空白对照孔不加样品及酶标试剂, 其余各步操作相同)、待测样品孔。在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液 40 μL, 然后再加待测样品 10 μL (样品最终稀释度为 5 倍)。加样将样品加于酶标板孔底部, 尽量不触及孔壁, 轻轻晃动混匀。
3. 加酶: 每孔加入酶标试剂 100 μL, 空白孔除外。
4. 温育: 用封板膜封板后置 37℃温育 60 分钟。
5. 配液: 将 20 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 20 倍稀释后备用。
6. 洗涤: 小心揭掉封板膜, 弃去液体, 甩干, 每孔加满洗涤液, 静置 30 秒后弃去, 如此重复 5 次, 拍干。
7. 显色: 每孔先加入显色剂 A 50 μL, 再加入显色剂 B 50 μL, 轻轻震荡混匀, 37℃避光显色 15 分钟。
8. 终止: 每孔加终止液 50 μL, 终止反应 (此时蓝色立转黄色)。
9. 测定: 以空白孔调零, 450nm 波长依序测量各孔的吸光度 (OD 值)。测定应在加终止液后 15 分钟以内进行。

注意事项:

1. 试剂盒从冷藏环境中取出应在室温平衡 15-30 分钟后方可使用, 酶标包被板开封后如未用完, 板条应装入密封袋中保存。样本在使用前也要在室温平衡 60 分钟。
2. 浓洗涤液可能会有结晶析出, 稀释时可在水浴中加温助溶, 洗涤时不影响结果。
3. 各步加样均应使用加样器, 并经常校对其准确性, 以避免试验误差。一次加样时间最好控制在 5 分钟内, 如标本数量多, 推荐使用排枪加样。
4. 请每次测定的同时做标准曲线, 最好做复孔。如标本中待测物质含量过高 (样本 OD 值大于标准品孔第一孔的 OD 值), 请先用样品稀释液稀释一定倍数 (n 倍) 后再测定, 计算时请最后乘以总稀释倍数 ($\times n \times 5$)。
5. 封板膜只限一次性使用, 以避免交叉污染。
6. 底物请避光保存。
7. 严格按照说明书的操作进行, 试验结果判定必须以酶标仪读数为准。
8. 所有样品, 洗涤液和各种废弃物都应按传染物处理。
9. 本试剂不同批号组分不得混用。
10. 如与英文说明书有异, 以英文说明书为准。

实验计算结果:

以所测标准品的 OD 值为横坐标, 标准品的浓度值为纵坐标, 在坐标纸上或用相关软件绘制标准曲线, 并得到直线回归方程, 将样品的 OD 值代入方程, 计算出样品的浓度。



(此图仅供参考)

试剂盒性能:

1. 样品线性回归与预期浓度相关系数 R 值为 0.95 以上。
2. 批内变异系数与批间变异系数应分别小于 10%和 15% 。

检测范围:

12.5 U/L – 400 U/L

灵敏度:

最低检测浓度小于 1.0 U/L

保存条件及有效期:

1. 试剂盒保存: 2-8℃。
2. 有效期: 6 个月

说明:

由于现有条件及科学技术水平尚不能对所有供货商提供的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。

1. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及当时的实验环境密切相关, 请务必准备充足的标本备份。
2. 不同批次的同一产品可能会有少许差别, 如: 检测限、灵敏度以及显色时间等, 请依据试剂盒内说明书进行实验操作, 网站电子版说明书仅作参考。
3. 只有全部使用本试剂盒配套试剂才能保证检测效果, 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。
4. 本公司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。
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。

关于订购详情或技术支持, 欢迎来电、来函、传真或电邮——

中国 | 上海仁捷生物科技有限公司

上海市杨浦区铁岭路 32 号 1519- 10 室

订购电话: +86 (021) 60346444

Email: renjiebio@163.com 主页: <http://www.rjkit.com/>

