

### 样品活化方法

生物样品中的通常以无活性的形式存在，在检测指标活性前必须进行活化处理。

活化方法如下：

**血清、血浆：** 280 μL标准品&样品稀释液中加入40 μL样品，混匀，加入40 μL活化试剂1，室温孵育10分钟。再加入40 μL活化试剂2，混匀后立即检测。

**注意：** 样品被稀释了10倍！

**细胞培养上清：** 20 μL标准品&样品稀释液中加入100 μL样品，混匀，加入40 μL活化试剂1，室温孵育10分钟。再加入40 μL活化试剂2，混匀后立即检测。

**注意：** 样品被稀释了2倍！

**组织匀浆：** 1960 μL标准品&样品稀释液中加入40 μL样品，混匀后检测。

**注意：** 样品被稀释了50倍！

### 精密度

板内精密度:低浓度样本,中浓度样本和高浓度样本分别在1块板上检测20次。板间精密度:低浓度样本,中浓度样本和高浓度样本分别在3块板上检测20次。

| 样本                       | 批内变异系数 |      |      | 批间变异系数 |      |      |
|--------------------------|--------|------|------|--------|------|------|
|                          | 1      | 2    | 3    | 1      | 2    | 3    |
| 数量                       | 20     | 20   | 20   | 20     | 20   | 20   |
| 平均值( MERGEFIELD 单位ng/mL) | 0.41   | 1.07 | 4.96 | 0.47   | 1.25 | 4.24 |
| 标准差                      | 0.02   | 0.05 | 0.22 | 0.03   | 0.06 | 0.2  |
| 变异系数 (%)                 | 4.88   | 4.67 | 4.43 | 6.38   | 4.8  | 4.72 |

### 线性

分别往5个样本中添加已知浓度的目标蛋白，做回收实验，得出回收率范围及平均回收率。将5个样本分别稀释2倍，4倍，8倍，16倍做回收实验，得出回收率范围及平均回收率。

|      |          | 血清(n=5) | 血浆(EDTA)(n=5) | 细胞上清(n=5) |
|------|----------|---------|---------------|-----------|
| 1:2  | 回收率范围(%) | 99-108  | 95-105        | 92-104    |
|      | 平均回收率(%) | 105     | 102           | 97        |
| 1:4  | 回收率范围(%) | 95-109  | 90-100        | 97-105    |
|      | 平均回收率(%) | 102     | 96            | 100       |
| 1:8  | 回收率范围(%) | 89-103  | 89-104        | 96-108    |
|      | 平均回收率(%) | 97      | 97            | 102       |
| 1:16 | 回收率范围(%) | 88-102  | 98-108        | 92-105    |
|      | 平均回收率(%) | 94      | 104           | 100       |

### 试剂盒组成及保存

未拆封的试剂盒可在4°C保存一周；如果一周以后才使用试剂盒，请拆开试剂盒按照下表中的条件分别保存各组分。

| 试剂盒组成 | 48孔配置    | 96孔配置    |
|-------|----------|----------|
| 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     |
| 标准品   | 0.3ml×6管 | 0.3ml×6管 |

|              |              |              |
|--------------|--------------|--------------|
| 酶标试剂         | 5 ml×1瓶      | 10 ml×1瓶     |
| 样品稀释液        | 3 ml×1瓶      | 6 ml×1瓶      |
| 显色剂A液        | 3 ml×1瓶      | 6 ml×1瓶      |
| 显色剂B液        | 3 ml×1瓶      | 6 ml×1瓶      |
| 终止液          | 3 ml×1瓶      | 6 ml×1瓶      |
| 20×浓缩洗涤液     | 15ml×1瓶      | 25ml×1瓶      |
| <b>试剂盒组成</b> | <b>48孔配置</b> | <b>96孔配置</b> |
| 说明书          | 1份           | 1份           |
| 封板膜          | 2片           | 2片           |
| 密封袋          | 1个           | 1个           |

说明：所有试剂瓶盖须旋紧以防止蒸发和微生物的污染。

试剂体积以实际发货版说明书为准。相关试剂在分装时会比标签上标明的体积稍多一些，请在使用时量取而非直接倒出。

### 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 $\mu$ L；。
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 $\mu$ L，然后再加待测样品10 $\mu$ L（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 $\mu$ L，空白孔除外。
4. 温育：用封板膜封板后置37 $^{\circ}$ C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A50 $\mu$ L，再加入显色剂B50 $\mu$ L，轻轻震荡混匀，37 $^{\circ}$ C避光显色15分钟。
8. 终止：每孔加终止液50 $\mu$ L，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。

### 试验所需自备物品

1. 酶标仪(450nm波长滤光片)
2. 高精度移液器，EP管及一次性吸头：0.5-10  $\mu$ L, 2-20  $\mu$ L, 20-200  $\mu$ L, 200-1000  $\mu$ L
3. 37 $^{\circ}$ C恒温箱，双蒸水或去离子水
4. 吸水纸