

小鼠转化受体电位阳离子通道亚家族 V 成员 1 (TrpV1) ELISA Kit

检测范围：125pg/mL-8000pg/mL

灵敏度：62.5pg/mL

本试剂盒仅供研究使用

检测原理：

试剂盒采用“夹心法”：将小鼠转化受体电位阳离子通道亚家族 V 成员 1 (TrpV1) 捕获抗体包被于酶标板上，捕获样品及标准品中的靶标，加入生物素标记的抗体与靶标结合，然后再加入酶结合物与生物素标记抗体结合，形成免疫复合物，加入 TMB 显色液后，若反应孔中有靶标则显蓝色，加入终止液变黄色，检测过程中游离的成分均被洗去，用酶标仪在 450 nm 处测 OD 值，颜色的深浅和样品中的小鼠转化受体电位阳离子通道亚家族 V 成员 1 (TrpV1) 呈正比，通过绘制标准曲线计算出标本中靶标的浓度。

试剂盒组分：

| 名称 | 规格（48T） | 规格（96T） |
|------------|-----------|-----------|
| 预包被酶标板 | 8×6 条 | 8×12 条 |
| 标准品 | 1 支 | 2 支 |
| 标准品/样品稀释液 | 10ml | 15ml |
| 生物素标记抗体 | 1 支（100×） | 1 支（100×） |
| 生物素标记抗体稀释液 | 10ml | 15ml |
| 酶结合物 | 1 支（100×） | 1 支（100×） |
| 酶结合物稀释液 | 10ml | 15ml |
| TMB 显色液 A | 3ml | 6ml |

| | | |
|-----------|------|--------|
| TMB 显色液 B | 3ml | 6ml |
| 终止液 | 3ml | 6ml |
| 20×浓缩洗涤液 | 10ml | 10ml×2 |
| 封板胶纸 | 2 张 | 4 张 |
| 产品说明书 | 1 份 | 1 份 |

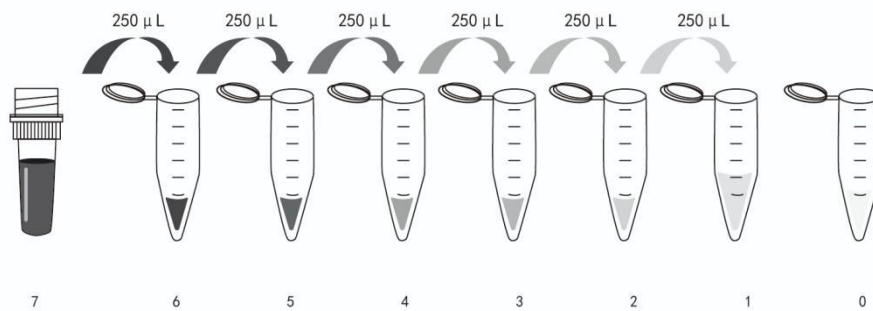
样本处理及要求：

1. 血清：将收集于血清分离管的全血样本在室温放置 2 小时或 2-8℃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样本，并将样本在采集后的 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检测结果），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，于冰上充分研磨或匀浆机研磨。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：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。
5. 细胞裂解液：贴壁细胞用预冷 PBS 轻轻清洗，然后用胰蛋白酶消化，1000xg 离心 5 分钟后收集细胞；悬浮细胞可直接离心收集。收集的细胞用预冷 PBS 清洗 3 次，每 1x10⁶ 个细胞中加入 150-200 μL PBS 重悬（推荐在 PBS 中加入蛋白酶抑制剂；若含量很低可适当减少 PBS 体积）并通过反复冻融或超声使细胞破碎。将提取液于 2-8℃，1500xg 离心 10 分钟，取上清检测。
6. 其它生物样本：1000×g 离心 20 分钟，取上清即可检测。

检测前试剂准备：

1. 提前 20 分钟从冰箱中取出试剂盒，平衡至室温。读数前 15 分钟打开酶标仪预热。

2. 洗涤液配置：用蒸馏水 1:20 稀释（例：1ml 浓缩洗涤液加入 19ml 的蒸馏水）。
3. 标准品配制：试剂盒中取出标准品，加入 1ml 标准品/样品稀释液溶解，盖好后室温静置大约 10 分钟。取 7 个 1.5ml 离心管，分别标注 S6, S5, S4, S3, S2, S1, S0 后每管各加入 250 μ l 标准品/样品稀释液。从 S7 中吸取 250 μ l 标准品到第一个离心管 S6 中，轻轻吹打混匀。从 S6 中吸取 250 μ l 到第二个 EP 管中(S5)，轻轻吹打混匀。依次倍比稀释浓度为 8000pg/mL, 4000pg/mL, 2000pg/mL, 1000pg/mL, 500pg/mL, 250pg/mL, 125pg/mL。以此类推进行标准品的倍比稀释。S0 为标准品/样品稀释液 (0pg/mL)。



4. 生物素标记抗体工作液配置:使用前 20 分钟,用生物素标记抗体稀释液将 100 \times 生物素标记抗体稀释成 1 \times 工作液, 根据所需用量配置, 当日使用, 剩余弃之。
5. 酶结合物工作液配置: 使用前 20 分钟, 用酶结合物稀释液将 100 \times 酶结合物稀释成 1 \times 工作液, 根据所需用量配置, 当日使用, 剩余弃之。
6. TMB 显色液的配置: 使用前 10 分钟, 将 TMB 显色液 A 液和 B 液 1:1 混合, 避光放置备用。

7. 如果您检测的样本中靶标浓度高于标准品最高值，请根据实际情况选择适当的稀释倍数(建议：将待测样本用样品稀释液最低稀释 1 倍，在正式实验之前做预实验，以确定具体稀释倍数)。

检测程序：

1. 加样：空白孔加入 100 μ l 标准品/样品稀释液，其余孔各加入标准品或待测样品 100 μ l，将反应板混匀后置 37 $^{\circ}$ C，60 分钟。
2. 弃液：弃去液体，甩干，不用洗涤
3. 加抗体：每孔加入 100 μ l 生物素标记抗体工作液 100 μ l，混匀后置 37 $^{\circ}$ C，60 分钟。
4. 洗板：用 1 \times 洗涤液将反应板充分洗涤 4-6 次，每孔加入 1 \times 洗液 350 μ l，每次震荡/浸泡 1-2 分钟，在滤纸上拍干。
5. 加酶结合物：每孔加入酶结合物工作液 100 μ l，混匀后置 37 $^{\circ}$ C，30 分钟。
6. 洗板：同步骤 4。
7. 加显色液：每孔加入提前配置好的 TMB 混合液 100 μ l，混匀后置 37 $^{\circ}$ C 暗处反应 10-20 分钟（具体显色时间根据显色结果而定）。
8. 加终止液：每孔加入 50 μ l 终止液，混匀，用酶标仪在 450nm 处测吸光值。

检测程序总结：

1. 加样品及标准品，37 $^{\circ}$ C 反应 60 分钟。
2. 加生物素标记抗体，37 $^{\circ}$ C 反应 60 分钟。洗涤 4-6 次。
3. 加酶结合物，37 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟。洗涤 4-6 次。
4. 加 TMB 显色液，37 $^{\circ}$ C 反应 10-20 分钟。
5. 加入终止液，读数。

注意事项

1. 试剂盒从冷藏环境中取出应在室温平衡 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。

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（ $\times n$ ）。
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。

保存条件及有效期

1. 试剂盒保存：； 2-8℃。
2. 有效期：6 个月

注意：

如果在 1 周内使用试剂盒，2-8° °C 储存。

如果超过 1 周使用，将酶标板、标准品、浓缩生物素化抗体/抗原、浓缩 HRP 酶结合物和通用稀释液取出（避光）冻存于-20° °C，其它试剂 2-8° °C 储存。避免反复冻融。