

# 人核仁磷酸蛋白 (NPM) ELISA Kit

**Catalog Number: BSKH63947**

本试剂盒用于定量检测人组织匀浆、细胞裂解液和其他生物液体等样本中核仁磷酸蛋白(NPM)含量。**使用前请仔细阅读说明书并检查试剂组分**，如有任何疑问请与北京博奥森生物技术有限公司联系，公司将为您提供强有力的技术支持。

**仅供研究，不用于临床诊断。**

## 目录

检测原理.....	3
试剂盒组成.....	3
其它实验材料.....	3
注意事项.....	4
样本收集、处理及保存方法.....	4
试剂准备.....	5
操作步骤.....	5
结果判断.....	6
试剂盒性能.....	7
检测范围.....	7
灵敏度.....	7

### 检测原理:

本试剂盒采用 ELISA 双抗体夹心法原理。用纯化的核仁磷酸蛋白 (NPM) 抗体包被微孔板, 向已包被的微孔板中依次加入标准品及待测样本, 待其与包被抗体充分结合后, 再与生物素化的 NPM 抗体结合, 其后加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的链霉亲和素, 生物素与链霉亲和素形成高强度的非共价结合, 经过彻底洗涤后加入底物 TMB 显色。TMB 在 HRP 酶的催化作用下转化成蓝色, 并在酸的作用下最终转化成黄色。颜色的深浅和样本中的 NPM 含量呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光值 (OD 值), 通过绘制标准曲线计算样本中 NPM 浓度。

### 试剂盒组成:

试剂盒组成	规格 (96T)	保存条件
抗体包被板条	8×12	-20℃ 保存
标准品	2 瓶	-20℃ 保存
稀释液	45ml×1 瓶	-20℃ 保存
检测溶液 A	120 μl×1 支	-20℃ 保存
检测溶液 B	120 μl×1 支	-20℃ 保存
浓缩洗涤液 (30×)	20ml×1 瓶	2-8℃ 保存
显色底物 (避光)	9ml×1 瓶	2-8℃ 保存
终止液	6ml×1 瓶	2-8℃ 保存
封板胶纸	4 张	
说明书	1 份	

### 其它实验材料 (不提供, 但可协助购买):

1. 酶标仪 (波长 450nm)
2. 高精度可调移液器 (已校准) 及吸头: 0.5-10, 2-20, 20-200, 200-1000 μl。  
一次检测样本较多时, 建议使用多通道移液器。
3. 自动洗板机或洗瓶
4. 37℃ 温箱
5. 双蒸水或去离子水

6.坐标纸

7.量筒

### **注意事项:**

1.试剂盒保存在 4°C & -20°C，已复溶但未用完的标准品，建议丢弃。不可混合使用不同来源或不同批号的试剂盒组分，请在有效期内使用本产品。

2.浓缩洗涤液低温取出可能会伴有结晶析出，稀释时可在水浴中加热助溶，不影响使用。

3.各步加样均应使用移液器，并经过校准，以免产生误差。建议一次加样时间最好控制在 5 分钟内，如样本数量较多，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。如样本中待测物质含量高于试剂盒检测上限（样本 OD 值大于标准品孔第一孔的 OD 值），请先用样本稀释液稀释一定的倍数（n 倍）后再测定，计算时需乘以总稀释倍数。

5.为避免交叉污染，在加入不同浓度的标准品、不同样本、不同试剂时谨记及时更换吸头，封板胶纸只限一次性使用。

6.显色底物请避光保存。

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。

### **样本收集、处理及保存方法:**

1.其它生物样本：检测分泌性的成分时，用无菌管收集，1000g 离心 20 分钟左右，收集上清。

2.组织匀浆：1）取适量组织块，于预冷 PBS 中清洗去除血液，称重后备用（组织块较大需先剪碎后再匀浆）； 2）可同时选用多种匀浆方法达到较好的破碎效果：首先将组织块移入玻璃匀浆器，加入 5-10mL 预冷 PBS 进行充分研磨，该过程需在冰上进行；得到的匀浆液可再利用超声破碎或反复冻融进一步处理； 3）将制备好的匀浆液于 5000×g 离心 5 分钟，取上清即可。

3.细胞裂解液：1）贴壁细胞需要先用胰酶消化，离心收集细胞（悬浮细胞可直接离心收集）； 2）将收集到的细胞用冷 PBS 洗 3 次； 3）物理方法裂解细胞（可先超声破碎细胞，再反复冻融）； 4）将标本于 4°C 1500×g 离心 10 分钟，收集上清备用。

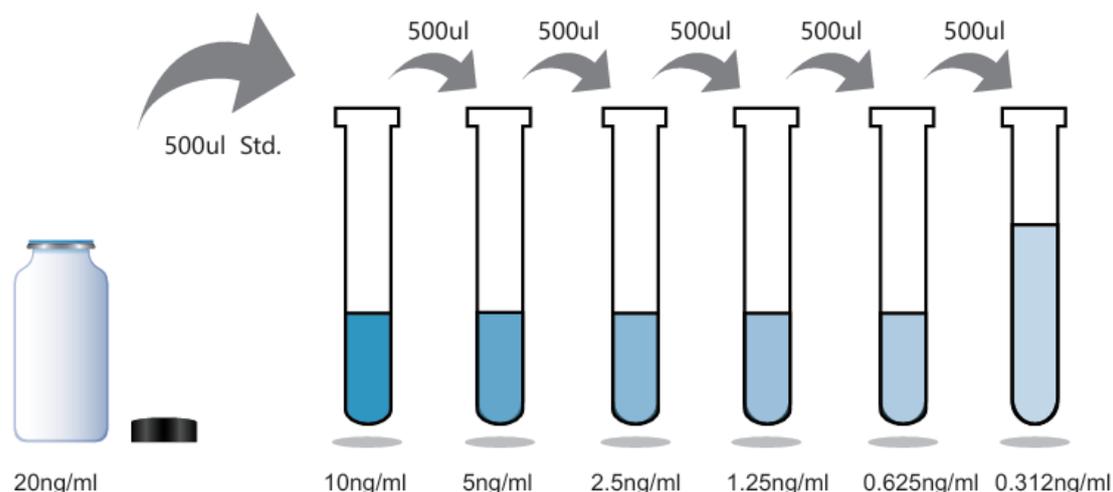
4.若样本无法立即检测，请将其按最小使用量分装，-20°C —— -70°C 保存，避免反复冻融。尽量避免使用溶血或高血脂样本。

### **试剂准备:**

1.试剂回温：请在实验前将试剂盒和待测样本置于室温下回温。

2.洗涤液配制：根据浓缩洗液的浓缩倍数，用双蒸水或去离子水进行相应倍数稀释后备用。

3.标准品梯度稀释：取 1ml 标准品/样本稀释液（S1）至冻干标准品中，静置 15 分钟待其完全溶解后轻轻混匀(浓度为 20ng/ml)，然后取 6 只聚丙烯试管，各加入 500  $\mu$ l 稀释液，按照以下浓度进行 2 倍稀释：10、5、2.5、1.25、0.625、0.312 ng/ml 进行稀释。20ng/ml 为标准曲线最高点浓度，稀释液作为标准曲线的零点（0ng/ml）。复溶过的标准品原液（20ng/ml）未用完的应废弃。



4.检测溶液A及检测溶液B：在使用前请手甩几下或少时离心处理，以使管壁或瓶盖的液体沉积到管底。临用前分别以稀释液 1:100稀释(如：10 $\mu$ L检测溶液A/990 $\mu$ L稀释液)，充分混匀，稀释前根据预先计算好的每次实验所需的总量配制(100 $\mu$ L/孔)，实际配制时应多配制 0.1-0.2mL。

#### **操作步骤：**

- 1.加样：根据试验所需用量，取出相应抗体包被板条，分别将已配制好的标准品、标准品零点及待测样本以 100 $\mu$ l/孔加入实验孔底部。
- 2.温育：用封板胶纸封板后置 37 $^{\circ}$ C温育 120min。
- 3.弃去液体，甩干，不用洗涤。
- 4.加检测溶液 A 工作液（临用前配制）：每孔加入检测溶液 A 工作液 100 $\mu$ l。
- 5.温育：用封板胶纸封板后置 37 $^{\circ}$ C温育 60 min。
- 6.洗涤：小心揭掉封板胶纸，弃去液体，甩干，每孔加满洗涤液（350 $\mu$ l），静置 1-2min 后弃去，如此重复 3 次，最后于吸水纸上拍干。
- 7.加检测溶液 B 工作液（临用前配制）：每孔加入检测溶液 B 工作液 100 $\mu$ l。
- 8.温育：用封板胶纸封板后置 37 $^{\circ}$ C温育 60 min。
- 9.洗涤：同上述洗涤过程（步骤 5），洗板 5 次。
- 10.显色：每孔加入 90 $\mu$ l 显色底物溶液，用封板胶纸封板后置 37 $^{\circ}$ C显色 15-25min。

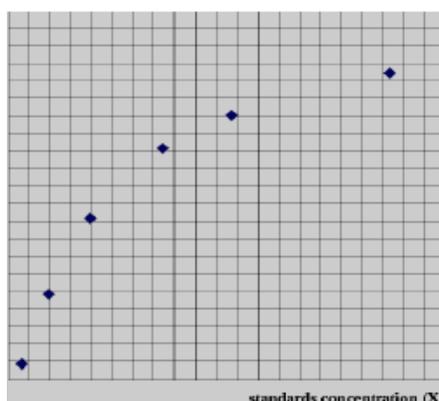
11.终止：每孔加终止液 50 $\mu$ l（此时蓝色立转黄色）。

12.测定：用酶标仪 450nm 波长测定各孔的吸光度（OD 值），测定应在加终止液后 5min 以内进行。

### 结果判定：

1.每个标准品和样本的 OD 值减去空白孔的 OD 值，为最终数值，如果做复孔,求其平均值。

2.使用计算机软件以吸光度 OD 值为纵坐标(Y),相应的 NPM 标准品浓度为横坐标(X),生成相应的标准曲线,样本的 NPM 含量可根据其 OD 值由标准曲线换算出相应的浓度。若样本 OD 值高于标准品曲线上限,请做适当倍数稀释,计算样本浓度时需乘以相应稀释倍数。



本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线为准

### 试剂盒性能：

批内与批间差应小于 10%

### 检测范围：

0.312 ng/ml -20 ng/ml

### 灵敏度：

0.128 ng/ml