

## Mouse ALK-1 ELISA Kit

产品编号: EK1519

规格: 96T

检测范围: 46.9pg/ml→3000pg/ml

敏感性: <2pg/ml

特异性: 系统和其它细胞因子无交叉反应。

保存: 2-8℃ (频繁使用时); -20℃ (长时间不用时)。

有效期: 6个月(4℃); 12个月(-20℃)。

用途: 用于体外定量分析小鼠血清、血浆、细胞培养上清或细胞裂解液。

### 工作原理

博士德所提供的小鼠 ALK-1 ELISA Kit 是典型的夹心法酶联免疫吸附测定试剂盒 (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay, ELISA)。预先包被的抗体为单克隆抗体。检测相抗体为单克隆抗体, 经生物素 (biotin) 标记。样品和生物素标记抗体先后加入酶标板孔反应后, PBS 或 TBS 洗涤。随后加入过氧化物酶标记的亲合素反应; 经过PBS 或 TBS 的彻底洗涤后用底物 TMB 显色。TMB 在过氧化物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小鼠 ALK-1 呈正相关。

### 试剂盒中内容 (96 孔)

内容	规格	数量
预包被抗小鼠 ALK-1 抗体的 96 孔板	96T	1 板
重组小鼠 ALK-1 冻干标准品	10ng/管	2 管
生物素标记抗小鼠 ALK-1(100X)	100ul	1 管
亲和素-过氧化物酶复合物 (ABC) (100X)	100ul	1 管
样品稀释液	30ml	1 瓶
抗体稀释液	12ml	1 瓶
ABC 稀释液	12ml	1 瓶
TMB 显色液	10ml	1 瓶
TMB 终止液	10ml	1 瓶
洗涤缓冲液(25X)	20ml	1 瓶
封板膜		4 张

**注意:** 使用前请检查试剂盒中试剂的标签和数量与表格是否一致

### 需要而未提供的试剂和器材

1. 标准规格酶标仪。
2. 自动洗板机。
3. 恒温箱
4. 系列可调节移液器及吸头, 一次检测样品较多时, 最好用多通道移液器。
5. 干净的试管和Eppendorf管。
6. 用去离子水将 25X 洗涤缓冲液稀释 25 倍, 成 1X 洗涤缓冲液。



## 注意事项

1. 使用前 TMB 显色液应为无色透明溶液，若发现颜色异常，请及时与厂家联系。
2. 用户在初次使用试剂盒时，应将各种试剂管离心数分钟，以便试剂集中到管底。
3. 要严格避免操作过程中酶标板干燥。干燥会使酶标板上生物成份迅速失活。
4. 为免交叉污染，要避免重复使用手中的吸头和试管。
5. 禁止混用不同批次试剂盒内的试剂。
6. 本公司提供的 96 孔酶标板是单条可拆型酶标板，用户可按需求使用；剩余的酶标板请按保存条件贮存。
7. 揭封板膜和覆盖封板膜时应避免用力过大导致液体溅出。

## 洗板方法

手工洗板方法：吸去（不可触及板壁）或甩掉酶标板内的液体；在实验台上铺垫几层吸水纸，酶标板朝下用力拍几次；将 1X 洗涤缓冲液至少 300ul 注入孔内，浸泡 1-2 分钟。根据需要，重复此过程数次。

自动洗板：如果有自动洗板机，应在熟练使用后再用到正式实验过程中。

## 样品的准备和保存

样品如果不立即分析，应分装后冷冻保存，且避免反复冻融。

血清——用干净试管收集血液，凝固 2 小时后离心  $1000 \times g$  10 分钟，收集血清。立即分析或分装后  $-20^{\circ}\text{C}$  冷冻保存。

血浆——采用肝素或 EDTA 抗凝，抽血后 30 分钟内离心  $2000 \times g$  15 分钟。立即分析或分装后  $-20^{\circ}\text{C}$  冷冻保存。

细胞培养上清——离心去除沉淀，立即分析或分装后  $-20^{\circ}\text{C}$  冷冻保存。

细胞裂解液——对于贴壁细胞，去除培养液，用 PBS、生理盐水或无血清培养液洗一遍。加入适量裂解液，用枪吹打数下，使裂解液和细胞充分接触。通常 10 秒后，细胞就会被裂解。对于悬浮细胞，离心收集细胞，用 PBS、生理盐水或无血清培养液洗一遍。加入适量裂解液，用枪吹打把细胞吹散，用手指轻弹以充分裂解细胞。充分裂解后， $10000-14000g$  离心 3-5 分钟，取上清。立即分析或分装后  $-20^{\circ}\text{C}$  冷冻保存。

## 样品稀释的一般原则

用户须估计样品待测因子的含量，决定适当的稀释倍数，以使稀释后样品中待测因子的浓度处于 ELISA 试剂盒的最佳检测范围。根据待测因子含量高、中、低的不同，分别采取不同的稀释方案：

高——指待测因子在  $30-300\text{ng/ml}$ 。一般按 1: 100 稀释。297ul 样品稀释液加 3ul 样品。

中——指待测因子在  $3-30\text{ng/ml}$ 。一般按 1: 10 稀释。225ul 样品稀释液加 25ul 样品。

低——指待测因子在  $46.9-3000\text{pg/ml}$ 。按 1: 2 稀释。100ul 样品稀释液加 100ul 样品。

特低——指待测因子  $\leq 46.9\text{pg/ml}$ 。样品一般不做稀释，或按 1: 2 稀释。

以上方案仅供参考，样品的稀释应有详细记录。

## 试剂的准备和保存

A. 小鼠 ALK-1 标准品的稀释和使用：在使用前 2 小时内准备。

试剂盒提供 2 管标准品，每管 10ng，每次使用 1 管。

1. 配制  $10,000\text{pg/ml}$  标准品：取 1ml 样品稀释液加入标准品管内，盖好后静置 10 分钟以上，然后反复颠倒/搓动以助溶解。

2. 配制  $3000\text{pg/ml}$  标准品：取 300ul  $10,000\text{pg/ml}$  的标准品加入有 700ul 样品稀释液的 Eppendorf



3. 配制 1500pg/ml→46.9pg/ml 标准品：准备 6 只 Eppendorf 管，每管加300ul 样品稀释液，分别标记上 1500pg/ml; 750pg/ml, 375pg/ml, 188pg/ml, 94pg/ml, 46.9pg/ml。取300ul 3000pg/ml的标准品加入标记 1500pg/ml 的管中，混匀后同样取出300ul，加入下一只管中。余同此类推，直到最后一只样品管。

**注意：**已经稀释的标准品（10,000pg/ml），应在 12 小时内使用。 -20℃冷冻保存条件下，2 天内可以使用,但不得反复冻融。

**B. 生物素标记抗小鼠ALK-1 抗体工作液：在使用前 2 小时内准备。**

1. 根据每孔需要 100ul 计算总的用量（实际配制时应多配制 100-200ul）。
2. 按 1ul 生物素标记抗小鼠 ALK-1 加抗体稀释液 99ul 的比例配制工作液。轻轻混匀。

**C. 亲和素-过氧化物酶复合物（ABC）工作液的准备：在使用前 1 小时内准备。**

1. 根据每孔需要 100ul 计算总的用量（实配时应多配制 100-200ul）。
2. 按 1ul 亲和素-过氧化物酶复合物（ABC）加 ABC 稀释液 99ul 的比例配制工作液。轻轻混匀。

## 操作程序

已稀释好的ABC和TMB显色液在加入酶标板孔前都应预先在 37℃中平衡至少 30 分钟。试剂或样品稀释时，**切不可忘记混匀**。每次检测都应该做标准曲线。用户须估计样品待测因子的含量，决定适当的稀释倍数。

3. 确定本次检测所需的已包被抗体的酶标板孔数目，并增加 1 孔作为 TMB 空白显色孔。总数=样品数+9；做双份检测时×2。其余重包装好放入冰箱中。
4. 将 3000pg/ml, 1500pg/ml; 750pg/ml, 375pg/ml, 188pg/ml, 94pg/ml, 46.9pg/ml 的标准品各 100ul 依次加入一排 7 孔中，1 孔只加样品稀释液的作为零孔。对于血清、血浆、细胞培养上清、细胞裂解液，每孔加 100ul 已用样品稀释液稀释的样品。
5. 酶标板加上封板膜，37℃反应 90 分钟。
6. 反应后用自动洗板机吸去酶标板内的液体；或甩去酶标板内液体，再对着吸水纸拍几下。不洗。
7. 将准备好的生物素抗小鼠ALK-1 抗体工作液按每孔100ul 依次加入（TMB 空白显色孔除外）。酶标板加上封板膜，37℃反应 60 分钟。
8. 1X 洗涤缓冲液洗涤 3 次，每次浸泡 1 分钟左右（每孔洗液至少 300ul）。
9. 将准备好的 ABC 工作液按每孔 100ul 依次加入（TMB 空白显色孔除外）。酶标板加上封板膜，37℃反应 30 分钟。
10. 1X 洗涤缓冲液洗涤 5 次，每次浸泡 1-2 分钟左右（每孔洗液至少 300ul）。
11. 按每孔依次加入 90ul TMB 显色液，37℃避光反应 15-20 分钟。

（注意：显色时间供参考，因用户实验室条件差异，最佳显色时间会有所不同。此时肉眼可见标准品的前 3-4 孔有明显的梯度蓝色，后 3-4 孔差别不明显）。

12. 按每孔 100ul 依次加入TMB 终止液，此时蓝色立转黄色。

13. 用酶标仪在 450nm 测定 O.D.值。

有两种设定空白对照的方案：

（1）将 TMB 空白显色孔（只加 TMB 显色液和终止液）设为对照。所有的标准品和样品的吸光值减去 TMB 空白显色孔的吸光值后，在坐标纸上画出曲线，以吸光值作为纵坐标，以浓度作为





(2) 将零孔设为对照。所有的标准品和样品的吸光值减去零孔的吸光值后，得到的数据可以直接在坐标纸上画出曲线。

14. 根据样品的吸光值在坐标上找出对应的浓度。用户也可以使用各种应用软件来计算。应记住由于样品稀释了N 倍，其实际浓度应该 $\times N$ 。

### 操作程序总结：

1. 加样品和标准品，37℃反应 90 分钟。不洗。
2. 加生物素标记抗体，37℃反应 60 分钟。1X 洗涤缓冲液洗涤 3 次。
3. 加 ABC，37℃反应 30 分钟。1X 洗涤缓冲液洗涤 5 次。
4. TMB37℃反应 15-20 分钟。
5. 加入 TMB 终止液，读数。

### 典型数据：

TMB37℃反应 15 分钟。

(数据供参考，不同用户最佳显色时间会有所不同)

浓度	0.0pg/ml	46.9pg/ml	93.8pg/ml	187.5pg/ml	375pg/ml	750pg/ml	1500pg/ml	3000pg/ml
O.D.	0.029	0.091	0.137	0.268	0.472	0.894	1.690	2.524