Rat ALCAM ELISA Kit

产品编号： EK1572

规格： 96T

检测范围： 78pg/ml→5000pg/ml。

特异性： 系统和其它细胞因子无交叉反应。

敏感性： ＜5pg/ml

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： 用于体外定量分析大鼠血清、血浆、细胞裂解液、细胞培养上清。

工作原理

博士德所提供的大鼠 ALCAM 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）。预先包被的抗体和检测相抗体都是亲和纯化多克隆抗体。检测相抗体经生物素（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和素反应；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 ALCAM 呈正相关。

试剂盒中内容(96 孔)

内容	规格	数量
预包被抗大鼠 ALCAM 抗体的 96 孔板	96T	1 板
重组大鼠 ALCAM 冻干标准品	10ng/管	2 管
生物素标记抗大鼠 ALCAM(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
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 Eppendof 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。

细胞培养上清——离心去除沉淀，立即分析或分装后-20℃冷冻保存。

血清——用干净试管收集血液，室温凝固 30 分钟，离心 1000×g 15 分钟，收集血清。立即分析或分装后-20℃冷冻保存。

血浆—采用肝素或 EDTA 抗凝，抽血后 30 分钟内离心 1000×g 15 分钟。立即分析或分装后-20℃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℃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 50-500ng/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 5-50ng/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 78 –5000pg/ml。按 1：2 稀释。100ul 样品稀释液加 100ul 样品。

特低——指待测因子≤78pg/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. ALCAM 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 10,000pg/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 5000pg/ml→156pg/ml 标准品：准备 7 只 Eppendorf 管，每管加 0.3ml 样品稀释液，分别标记上 5000pg/ml，2500pg/ml，1250pg/ml，625pg/ml，312pg/ml，156pg/ml，78pg/ml。取 0.3ml 10,000pg/ml 的标准品加入标记 5000pg/ml 的管中，**混匀**后同样取出 0.3ml，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. 生物素标记抗大鼠 ALCAM 抗体工作液的准备：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 生物素标记抗大鼠 ALCAM 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**。

注意：已稀释好的 ABC 应预先在 37℃中平衡至少 30 分钟后加入孔内。

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。

1. 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。
2. 将 5000pg/ml ，2500pg/ml，1250pg/ml，625pg/ml，312pg/ml，156pg/ml，78pg/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。对于大鼠血清、血浆、细胞裂解液、细胞培养上清、母乳，直接加已用样品稀释液稀释的样品 100ul。
3. 酶标板加上封板膜，37℃反应 90 分钟。
4. 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**。
5. 将准备好的生物素抗大鼠 ALCAM 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。
6. 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）。
7. 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。
8. 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）。

9. 按每孔 90ul 依次加入已在 37℃平衡 30 分钟的 TMB 显色液，37℃避光反应 20-25 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）。
10. 按每孔 100ul 依次加入终止液，此时蓝色立转黄色。
11. 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，以浓度作为横坐标。

（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。

12. 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×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 20-25 分钟。
5. 加入终止液，读数。

典型数据

TMB37℃反应 20 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	78pg/m	156pg/ml	313pg/ml	625pg/ml	1250pg/ml	2500pg/ml	5ng/ml
O.D.	0.030	0.125	0.224	0.376	0.708	1.187	1.843	2.228