



## Mouse AFP ELISA Kit

产品编号: EK1661

规格: 96T

检测范围: 312pg/ml→20ng/ml

敏感性: <5pg/ml

特异性: 系统和其它细胞因子无交叉反应。

保存: 2-8°C (频繁使用时); -20°C (长时间不用时)。

有效期: 6 个月(4°C); 12 个月 (-20°C)。

用途: 用于体外定量分析小鼠血清、血浆、细胞培养上清。

### 工作原理

博士德所提供的小鼠 AFP 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近 100% 纯度的多克隆抗体。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小鼠 AFP 呈正相关。

### 试剂盒中内容 (96 孔)

内容	规格	数量
预包被抗小鼠 AFP 抗体的 96 孔板	96T	1 板
重组小鼠 AFP 冻干标准品	20ng/管	2 管
生物素标记抗小鼠 AFP(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 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  $2000 \times g$  20 分钟, 收集血清。立即分析或分装后-20°C冷冻保存。

血浆——采用柠檬盐抗凝, 抽血后 30 分钟内离心  $2000 \times g$  10 分钟。立即分析或分装后-20°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°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 200-2000ng/ml。按 1: 100 稀释。297ul 样品稀释液加 3ul 样品。

中——指待测因子在 20-200ng/ml。按 1: 10 稀释。225ul 样品稀释液加 25ul 样品。

低——指待测因子在 312-20,000pg/ml。1: 2 稀释。100ul 样品稀释液加 100ul 样品。

特低——指待测因子  $\leq 312 \text{ pg/ml}$ 。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 AFP 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 20ng, 每次使用 1 管。

1. 配制 20ng/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。

- 配制 10ng/ml→0.312ng/ml 标准品：准备 6 只 Eppendorf 管，每管加 0.3ml 样品稀释液，分别标记上 10ng/ml, 5ng/ml, 2.5ng/ml, 1.25ng/ml, 0.625ng/ml, 0.312ng/ml。取 0.3ml 20ng/ml 的标准品加入标记 10ng/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 (20,000pg/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 AFP 抗体工作液：**在使用前 2 小时内准备。

- 根据每孔需要 100ul 计算总的用量 (实际配制时应多配制 100-200ul)。
- 按 1ul 生物素标记抗小鼠 AFP 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。

- 根据每孔需要 100ul 计算总的用量 (实配时应多配制 100-200ul)。
- 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。

- 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。
- 将 20,000pg/ml, 10,000pg/ml, 5000pg/ml, 2500pg/ml, 1250pg/ml, 625pg/ml, 312pg/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，每孔加 100ul 已用样品稀释液稀释的样品。
- 酶标板加上封板膜，37℃ 反应 90 分钟。
- 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。
- 将准备好的生物素抗小鼠 AFP 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。
- 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)。
- 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。
- 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)。
- 按每孔 90ul 依次加入 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)。
- 按每孔 100ul 依次加入终止液，此时蓝色立转黄色。
- 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  $\times N$ 。

#### 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	312pg/ml	625pg/ml	1250pg/ml	2500pg/ml	5ng/ml	10ng/ml	20ng/ml
O.D.	0.082	0.150	0.167	0.296	0.540	0.907	1.498	2.083