

## Mouse Fas ELISA Kit

产品编号: EK0336

规格: 96T

检测范围: 31.2pg/ml→2000pg/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、细胞裂解液、细胞培养上清。

### 工作原理

FAS,也称 APO-1,CD95,TNFRSF6。是一种细胞表面受体,将 FASL 的信号传导入细胞内。是一个分子量 43-48KDa 的糖蛋白。它属于 TNF 受体家族,和 TNFR1 有共同的“死亡区”,结合细胞内分子,启动细胞内凋亡过程。在上皮细胞、肝细胞、成熟淋巴细胞和肿瘤细胞有高表达。

博士德所提供的小鼠 FAS 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,检测相抗体为多克隆抗体,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 FAS 呈正相关。

### 试剂盒中内容 (96 孔)

| 内容                        | 规格     | 数量  |
|---------------------------|--------|-----|
| 预包被抗小鼠 FAS 抗体的 96 孔板      | 96T    | 1 板 |
| 重组小鼠 FAS 冻干标准品            | 10ng/管 | 2 管 |
| 生物素标记抗小鼠 FAS(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 30 分钟后离心  $1000 \times g$  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、柠檬酸盐或 EDTA 抗凝，抽血后 30 分钟内离心  $1000 \times g$  10 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  $20-200\text{ng/ml}$ 。一般按 1: 100 稀释。297ul 样品稀释液加 3ul 样品。

中——指待测因子在 2-20ng/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 31.2→2000pg/ml。按 1: 2 稀释。100ul 样品稀释液加 100ul 样品。  
特低——指待测因子≤31.2pg/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 sFAS 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 2000pg/ml 标准品: 取 0.2ml 10,000pg/ml 的标准品加入有 0.8ml 样品稀释液的 Eppendorf 管中, 混匀, 做上标记。
3. 配制 1000pg/ml→31.2pg/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 1000pg/ml, 500pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 62.5pg/ml, 31.2pg/ml。取 0.3ml 2000pg/ml 的标准品加入标记 1000pg/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. 生物素标记抗小鼠 FAS 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 FAS 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。

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 2000pg/ml, 1000pg/ml, 500pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 62.5pg/ml, 31.2pg/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、细胞裂解液、细胞培养上清, 每孔加 100ul 已用样品稀释液稀释的样品。
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小鼠 FAS 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 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)。
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。

请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. TMB 37℃ 反应 15-20 分钟。
5. 加入终止液, 读数。

#### 典型数据

TMB 37℃ 反应 16 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 | 31.2pg/ml | 62.5pg/ml | 125pg/ml | 250pg/ml | 500pg/ml | 1000pg/ml | 2000pg/ml |
|------|----------|-----------|-----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|
| O.D. | 0.036    | 0.102     | 0.163     | 0.283    | 0.482    | 0.894    | 1.542     | 2.293     |