



Mouse MBL2 ELISA Kit

- 产品编号: EK0806
 规格: 96T
 检测范围: 0.312ng/ml→20ng/ml
 敏感性: <10pg/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、细胞裂解液或细胞培养上清。

工作原理

博士德所提供的小鼠 MBL2 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 MBL2 呈正相关。

试剂盒中内容 (96 孔)

内容	规格	数量
预包被抗小鼠 MBL2 抗体的 96 孔板	96T	1 板
重组小鼠 MBL2 冻干标准品	20ng/管	2 管
生物素标记抗小鼠 MBL2(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。

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 2000×g 20 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 分钟内在 2-8℃离心 2000×g 20 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 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。一般按 1: 10 稀释。225ul 样品稀释液加 25ul 样品。

低——指待测因子在 0.312→20ng/ml。按 1: 2 稀释。100ul 样品稀释液加 100ul 样品。

特低——指待测因子≤0.312ng/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 MBL2 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。
2. 配制 10ng/ml→0.312ng/ml 标准品：准备 6 只 Eppendorf 管，每管加300ul 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300ul 20ng/ml 的标准品加入标记 10ng/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（20ng/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 MBL2 抗体工作液。

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 MBL2 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 20ng/ml, 10ng/ml, 5ng/ml, 2.5ng/ml, 1.25ng/ml, 0.625ng/ml, 0.312ng/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。对于小鼠血清、血浆、细胞裂解液或细胞培养上清，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 MBL2 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TMB终止液，此时蓝色立转黄色。

11. 用酶标仪在 450nm 测定 O.D.值。



(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 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	0.0ng/ml	0.312ng/ml	0.625ng/ml	1.25ng/ml	2.5ng/ml	5ng/ml	10ng/ml	20ng/ml
O.D.	0.017	0.056	0.122	0.266	0.627	1.168	1.726	2.029