

Mouse CD40L&Soluble CD40 ligand ELISA Kit

检测原理:

攸碧艾的 ELISA 试剂盒采用“夹心法”:将捕获抗体包被于酶标板上,捕获样品及标准品中的靶蛋白,生物素化的检测抗体与靶蛋白结合, SABC 复合物与生物素化检测抗体结合,形成免疫复合物,加入 TMB 显色液后,若反应孔中有靶蛋白则显蓝色,加入终止液变黄色,检测过程中游离的成分均被洗去,用酶标仪在 450 nm 处测 OD 值,靶蛋白浓度与 OD 值之间呈正比,通过绘制标准曲线计算出标本中靶蛋白的浓度。

试剂盒组分: (保存温度 4°C)

名称	规格 (48 T)	规格 (96 T)
预包被酶标板	8×6 条	8×12 条
标准品	1 支	1 支
标准品/样品稀释液	10ml	15ml
生物素化检测抗体 (100×)	1 支	1 支
生物素化检测抗体稀释液	6ml	12ml
SABC 复合物	6ml	12ml
TMB 显色液 (A/B)	各 3ml	各 6ml
终止液	6ml	12ml
20×浓缩洗涤液	30ml	60ml
封板胶纸	2 张	4 张
产品说明书	1 份	1 份

本试剂盒适用于血清、血浆、组织匀浆、细胞培养上清及其它生物体液。

标本收集与试剂准备:

- 血清、血浆样本收集应使用一次性的无热原,无内毒素试管 (EDTA、柠檬酸盐、肝素抗凝均可),血清、血浆避免使用溶血,高血脂标本,标本悬浮物应离心去除,使标本清澈透明。待测样本应尽早检测,2-8°C 保存 48 小时;更长时间须冷冻 (-20°C 或 -80°C) 保存,避免反复冻融。
- 洗涤液配置:用蒸馏水 1:20 稀释 (例:1ml 浓缩洗涤液加入 19ml 的蒸馏水)
- 标准品配制:取 8 个 1.5ml 离心管,分别标注 S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, blank, 第一管 S1 中加入标准品/样品稀释液 900ul, 第二至第八管中分别加入标准品/样品稀释液 200ul, 在第一管中加入 (40000pg/ml) 标准品溶液 100ul 置于漩涡混合器上混匀后用加样器吸出 200ul, 移至第二管, 如此反复作对倍稀释, 从第七管中吸出 200ul 弃去, 第八管为空白对照。标准曲线浓度为:4000、2000、1000、500、250、125、62.5、0 pg/ml (标准品的用量及标准曲线范围也可根据自己需要配置)。



- 生物素化抗体工作液配置:使用前 20 分钟,用生物素化抗体稀释液将 100×生物素化抗体稀释成 1×工作液,根据所需用量配置,当日使用,剩余弃之。

5. TMB 显色液的配置：使用前 10 分钟，将 TMB 显色液 A 液和 B 液 1: 1 混合，避光放置备用。
6. 如果您检测的样本中靶蛋白浓度高于标准品最高值，建议重新检测，请根据实际情况，适当倍数稀释(建议做预实验，以确定稀释倍数)。

检测程序：

1. 加样：空白孔加入 50 μ l 标准品/样品稀释液，其余孔各加入标准品或待测样品 50ul，将反应板混匀后置 37°C，40 分钟。
2. 洗板：用 1 \times 洗涤液将反应板充分洗涤 4-6 次，每孔加入 1 \times 洗液 350 μ l，每次震荡/浸泡 1-2 分钟，向滤纸上印干。
3. 空白孔加入 100ul 生物素化抗体稀释液，其余孔各加入 1 \times 的生物素化抗体工作液 100ul，混匀后置 37°C，30 分钟。
4. 洗板：同上。
5. 每孔加入 SABC 复合物工作液 100ul，混匀后置 37°C，20 分钟。
6. 洗板：同上。
7. 每孔加入提前配置好的 TMB 混合液 100ul，混匀后置 37 °C 暗处反应 10-20 分钟（具体显色时间根据显色结果而定）。
8. 每孔加入 100ul 终止液，混匀，30 分钟内用酶标仪在 450nm 处测吸光值。

结果判断与计算：

1. 所有 OD 值建议减除空白孔值后再进行计算，如空白孔 OD 低于 0.1，也可以直接计算。
2. 以标准品浓度作横坐标，OD 值作纵坐标，手工绘制或用软件绘制标准曲线，根据样品 OD 值计算出相应含量，再乘以稀释倍数即可。

试剂盒性能：

- 1、灵敏度：可测浓度小于 12.5pg/ml。
- 2、特异性：同时可检测重组或天然的小鼠(CD40L/Soluble CD40 ligand)，不与小鼠其它细胞因子有交叉反应。
- 3、重复性：板内，板间变异系数均小于 10%。

注意事项

1. 在试验中标准品和样本检测时建议作双孔检测，每次检测都应做标准曲线。
2. 洗涤过程很关键，洗涤不充分将导致精确度误差及 OD 值错误地升高，从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶，属于正常现象，37°C 水浴使结晶完全溶解后再配制洗涤液。
3. 检测时所有试剂都要恢复到室温，板条开封后剩余板条需封好，放回袋中 1 个月内用完。
4. 试剂盒使用超敏 TMB 溶液，显色过深时会出现沉淀状，属正常现象，混匀即可，不影响结果判读。
5. 说明书以试剂盒内纸质版为准，本试剂盒仅用于科研，不能用于临床诊断！