

# 人促血管生成素受体-2(Tie-2)ELISA 试剂盒

(用于血清、血浆、组织匀浆、细胞培养上清液和其它生物体内)

## 原理

本实验采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法。用抗人 Tie-2 单抗包被于酶标板上,标准品和样品中的 Tie-2 与单抗结合,加入生物素化的抗人 Tie-2,形成免疫复合物连接在板上,辣根过氧化物酶标记的 Streptavidin 与生物素结合,加入底物工作液显蓝色,最后加终止液硫酸,在 450nm 处测 OD 值,Tie-2 浓度与 OD 值成正比,可通过绘制标准曲线求出标本中 Tie-2 浓度。

## 试剂盒组成 (2-8℃保存)

|                                 |      |                            |      |
|---------------------------------|------|----------------------------|------|
| 酶标板 (Coated Wells)              | 96孔  | 酶标抗体工作液 (Enzyme Conjugate) | 12ml |
| 10×标本稀释液 (Sample Buffer)        | 12ml | 20×浓缩洗涤液 (Wash Buffer)     | 50ml |
| 标准品 (Standards): 4ng/瓶          | 2瓶   | 底物工作液 (TMB Solution)       | 12ml |
| 第一抗体工作液 (Biotinylated Antibody) | 6ml  | 终止液 (Stop Solution)        | 12ml |

## 准备试剂与收集血样

- 10×标本稀释液用蒸馏水作 1:10 倍稀释 (示例: 1ml 浓稀释液+9ml 蒸馏水)。
- 收集标本: 血清、血浆 (EDTA、柠檬酸盐、肝素抗凝)、细胞培养上清液、组织匀浆等尽早检测, 2-8℃保存 48 小时; 更长时间须冷冻 (-20℃或-70℃) 保存, 避免反复冻融。血清、血浆至少作 1:50 稀释 (取 10ul, 加标本稀释液 490ul, 稀释 50 倍)。细胞上清做 5 倍稀释。
- 标准品液配制: 使用前加入 1ml 蒸馏水混匀, 配成 4000pg/ml 的溶液。设标准管 8 管, 每管加入标本稀释液 200ul。在第一管中加入 4000pg/ml 的标准品溶液 200ul 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。
- 洗涤液: 用重蒸水 1:20 稀释 (示例: 1ml 浓缩洗涤液加入 19ml 的重蒸水)

## 检测程序

1. 加样: 每孔各加入标准品或待测样品 100ul, 将反应板充分混匀后置 37℃40 分钟。
2. 洗板: 用洗涤液将反应板充分洗涤 4-6 次, 向滤纸上印干。
3. 每孔加入蒸馏水和第一抗体工作液各 50ul(空白除外)。将反应板充分混匀后置 37℃20 分钟。
4. 洗板: 同前。
5. 每孔加酶标抗体工作液 100ul。将反应板置 37℃10 分钟。
6. 洗板: 同前。
7. 每孔加入底物工作液 100ul, 置 37℃暗处反应 15 分钟。
8. 每孔加入 100ul 终止液混匀。
9. 30 分钟内用酶标仪在 450nm 处测吸光值。

## 结果计算与判断

1. 所有 OD 值建议减除空白值后再行计算。如空白 OD 低于 0.1, 也可以直接计算。
2. 以标准品 2000、1000、500、250、125、62.5、31.2、0 pg/ml 为横坐标, OD 值为纵坐标, 使用软件作图, 画出标准曲线。
3. 根据样品 OD 值计算出相应 Tie-2 含量, 再乘上稀释倍数即可。软件可以向本公司邮件索取。

## 试剂盒性能

1. 灵敏度: 最小的 Tie-2 检测浓度小于 16pg/ml。
2. 特异性: 可同时检测重组或天然的人 Tie-2。不与人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 10.5%。

## 注意事项

1. 以上标准孔及待测样品均建议做复孔, 每次测定应同时做标准曲线。
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。
3. 检测时所有试剂都要恢复到室温。板条开封后剩余板条要再封好, 保持板条干燥。
4. 试剂盒使用超敏 TMB 溶液, 若显色过深会出现絮状物, 属正常现象, 不影响结果判读。
5. 说明书中试剂盒组成为 96T 的量, 48T 的量应减半!
6. 本试剂盒宜置 4℃冰箱保存。仅用于科研, 不能用于临床诊断!