

大鼠核转录因子 p65 (NF-κB p65)ELISA 试剂盒

原理

本实验采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法。用抗大鼠 NF-κB p65 单抗包被于酶标板上, 标准品和样品中的 NF-κB p65 与单抗结合, 加入生物素化的抗大鼠 NF-κB p65, 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, NF-κB p65 浓度与 OD 值成正比, 可通过绘制标准曲线求出标本中 NF-κB p65 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) : 20ng/ml	1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。
- 标准品液配制: 取 8 个 1.5ml 离心管, 第一管加标本稀释液 900ul, 第二至第八管加入标本稀释液 500ul。在第一管中加入 20ng/ml 的标准品溶液 100ul 置于漩涡混合器上混匀后用加样器吸出 500ul, 移至第二管。如此反复作对倍稀释, 从第七管中吸出 500ul 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)

标本激活方法

- 将 320ul 标本稀释液加入到一支 1.5ml 进口聚丙烯管中, 再加 40ul 血清或血浆或组织标本。
- 加 20ul 1 N HCl, 盖紧, 上下混匀。2-8℃ 放置 60± 2 分钟。
- 加 20ul 1 N NaOH, 盖紧, 上下混匀。
- 即用, 或放 -20/-70℃ 保存 3 天。计算结果时乘以稀释倍数 10。(注意: 不同的标本 NF-κB p65 的水平可能有较大差异, 请根据实际情况灵活掌握稀释度)
- 细胞培养上清 2 倍稀释 (60ul 的标本稀释液 + 100ul 样本 + 20ul 的 1N HCl + 20ul 的 1N NaOH)。
- 尿液直接活化 1.4 倍稀释 (100ul 尿液 + 20ul 的 1N HCl + 20ul 的 1N NaOH)

检测程序

- 加样: 每孔各加入标准品或待测样品 (已激活) 100ul, 将反应板充分混匀后置 37℃ 40 分钟。
- 洗板: 用洗涤液将反应板充分洗涤 4-6 次, 向滤纸上印干。
- 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。
- 洗板: 同前。
- 每孔加酶标抗体工作液 100ul。将反应板置 37℃ 10 分钟。
- 洗板: 同前。
- 每孔加入底物工作液 100ul, 置 37℃ 暗处反应 15 分钟。
- 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。

结果计算与判断

- 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。
- 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。
- 根据样品 OD 值计算出相应 NF-κB p65 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

- 灵敏度: 最小的 NF-κB p65 检测浓度小于 15pg/ml。
- 特异性: 可同时检测重组或天然的大鼠 NF-κB p65。不与大鼠其它细胞因子有交叉反应。
- 重复性: 板内、板间变异系数均小于 8.9%。

注意事项

- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 说明书中试剂盒组成为 96T 的量, 48T 的量应减半!
- 本试剂盒宜置 4℃ 冰箱保存。仅用于科研, 不能用于临床诊断!