

Uscn

Life Science Inc.

www.uscnk.com; www.uscnk.us

E-mail: uscnk@uscnk.com

小鼠肠型脂肪酸结合蛋白(FABP2)酶联免疫吸附测定

试剂盒使用说明书

产品编号: E90559Mu

规格: 96T

本试剂盒仅供体外研究使用, 不用于临床诊断!

预期应用

本酶联免疫吸附测定试剂盒运用双抗体夹心 ELISA 法定量测定小鼠血清、血浆或其它相关生物液体中 FABP2 含量。

本试剂盒已提供的试剂

试剂名称	数量	试剂名称	数量
96孔板(预包被)	1	96孔板覆膜	4
标准品 (冻干)	2	标准品稀释液	1 × 20ml
检测溶液A (绿色)	1 × 120μl	检测稀释液A(2 x)	1 × 6ml
检测溶液B (红色)	1 × 120μl	检测稀释液B(2 x)	1 × 6ml
TMB底物	1 × 9ml	终止液	1 × 6ml
浓洗涤液(30 x)	1 × 20ml	使用说明书	1

本试剂盒未提供但需自备的设备及试剂

- 1、450±10nm 滤光片的酶标仪 (建议仪器使用前提前预热)
- 2、单道和多道微量加液器及吸头
- 3、稀释样品的 EP 管
- 4、蒸馏水或去离子水
- 5、吸水纸
- 6、盛放洗液的容器

试剂盒的储存及有效期

所有试剂均按试剂瓶标签上所示保存。请注意, 收到试剂盒后请尽快将标准品、检测溶液 A、检测溶液 B 以及 96 孔板保存于-20℃。开封后的酶标板要密封加干燥剂后保存于-20℃, 避免潮湿。有效期为 6 个月。

实验原理

将 FABP2 抗体包被于 96 孔微孔板中，制成固相载体，向微孔中依次加入标准品和标本，其中的 FABP2 与连接于固相载体上的抗体结合，然后加入生物素化的 FABP2 抗体，将未结合的生物素化抗体洗净后，加入 HRP 标记的亲合素，再次彻底洗涤后加入底物(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 FABP2 呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度(O.D.值)，计算样品浓度。

标本的采集与保存

- 1、血清：将收集于血清分离管的全血标本在室温放置 30 分钟或 4℃过夜，然后 1000×g 离心 20 分钟，取上清即可检测，或将上清置于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。
- 2、血浆：用 EDTA 或肝素作为抗凝剂采集标本，并将标本在采集后的 30 分钟内于 2 - 8℃ 1000×g 离心 15 分钟，取上清即可检测，或将上清置于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。
- 3、其它生物标本：请 1000×g 离心 20 分钟，取上清即可检测，或将上清置于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。

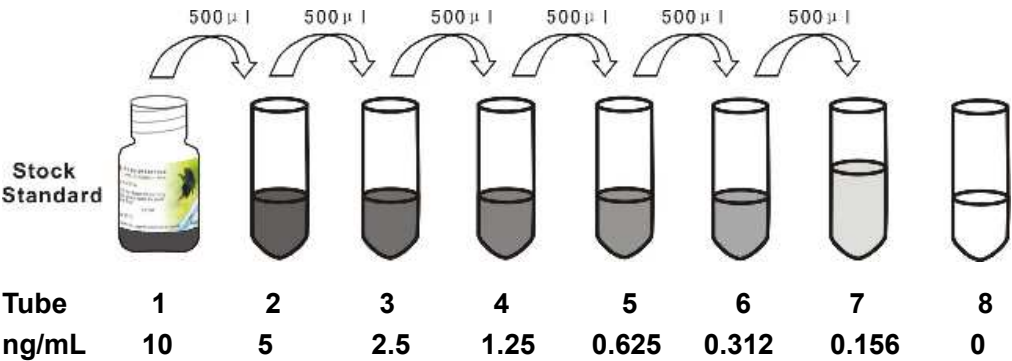


注意：

- 1、以上标本均需密封保存，4℃保存应小于 1 周，-20℃不应超过 1 个月，-80℃不应超过 2 个月。
- 2、标本使用前应缓慢均衡至室温，不应加热使之融解。
- 3、标本溶血会影响最后检测结果，因此溶血标本不宜进行此项检测。

试剂准备

- 1、使用前将所有的试剂和标本缓慢均衡至室温(18-25℃)，试剂不能直接在 37℃溶解。
- 2、**标准品**（冻干品）：每瓶 标准品用**标准品稀释液**稀释至 1mL，盖好后室温静置大约 10 分钟，同时反复颠倒/搓动以助溶解，其浓度为 10 ng/mL。准备 7 个稀释标准品的 EP 管，每个 EP 管中加入 500μl 的**标准品稀释液**，如图所示依次倍比稀释成 10 ng/mL，5 ng/mL，2.5 ng/mL，1.25 ng/mL，0.625 ng/mL，0.312 ng/mL，0.156 ng/mL，标准品稀释液（0 ng/mL）直接作为空白孔。**为保证实验结果有效性，每次实验请使用新的标准品溶液。**



- 3、**检测稀释液 A 及检测稀释液 B**：用 6mL 蒸馏水或去离子水将 6mL 浓检测液 A 及 B 稀释至 12mL，进行 2 倍稀释，稀释后的工作液不宜进行冷冻保存。

- 4、**检测溶液 A 及检测溶液 B:** Detection A 及 Detection B 在使用前请手甩几下或少时离心处理,以使管壁或瓶盖的液体沉积到管底。临用前分别以**检测稀释液 A 或 B**1:100 稀释(如: 10 μ l检测溶液 A / 990 μ l检测稀释液 A),充分混匀,稀释前根据预先计算好的每次实验所需的总量配制(100 μ l/孔),实际配制时应多配制 0.1-0.2mL。
- 5、**浓洗涤液:**用 580mL 蒸馏水或去离子水将 20mL 浓洗涤液稀释至 600mL,进行 30 倍稀释。
- 6、**底物溶液:**请用灭菌的移液器吸头吸取所需体积的 TMB 至另一干净容器中使用,容器中剩余的底物应予丢弃,不要倒回 TMB 瓶中。



注意:

- 1、**标准品**请于临用前 15 分钟内配制。**该标准品只能使用一次。**
- 2、标准品的稀释不能直接在板中进行。
- 3、**标准品、检测溶液 A 工作液、检测溶液 B 工作液**请使用相应的稀释液配制,不能混淆。混匀时要轻轻充分混匀,避免起泡。为保证实验结果的准确请使用微量吸管,并校准微量加液器。请依据所需的量精确配制,尽量不要微量配制(如吸取**检测溶液 A**时,一次不要小于 10 μ l),以避免造成浓度误差。
- 4、请勿重复使用已经稀释过的**标准品、检测溶液 A 工作液和检测溶液 B 工作液。**
- 5、**浓洗涤液**中如有结晶析出,请先温育至室温,轻轻混匀,至到结晶完全溶解再进行配制。

操作步骤

实验前应预测标本含量,如果标本浓度过高,应对标本进行稀释,使稀释后的标本符合试剂盒的检测范围,计算时再乘以相应的稀释倍数。

- 1、加样:分别设标准孔、待测样品孔、空白孔。设标准孔 7 孔,依次加入 100 μ l 不同浓度的标准品(见试剂准备 2)。空白孔加 100 μ l(见试剂准备第二步最后一管),余孔加待测样品 100 μ l,酶标板加上覆膜,37°C温育 2 小时。
- 2、弃去液体,甩干,不用洗涤。
- 3、每孔加**检测溶液 A 工作液** 100 μ l(临用前配制),酶标板加上覆膜,37°C温育 1 小时。
- 4、弃去孔内液体,每孔用 350 μ l 的洗涤液洗涤,浸泡 1-2 分钟,甩干(也可轻拍将孔内液体拍干),重复洗板 3 次。最后一次洗涤后,要把孔内的洗涤液完全甩干。
- 5、每孔加**检测溶液 B 工作液**(临用前配制) 100 μ l,加上覆膜,37°C温育 30 分钟。
- 6、弃去孔内液体,甩干,洗板 5 次,方法同步骤 4。
- 7、每孔加**底物溶液** 90 μ l,酶标板加上覆膜,37°C**避光显色**(反应时间控制在 20-30 分钟,不要超过 30 分钟。当标准孔的前 3-4 孔有明显的梯度蓝色,后 3-4 孔梯度不明显时,即可终止)。
- 8、每孔加**终止溶液** 50 μ l,终止反应,此时蓝色立转黄色。终止液的加入顺序应尽量与底物溶液的加入顺序相同。如出现颜色不匀一,请轻轻晃动 酶标板以使溶液混合均匀。
- 9、在确保酶标板底无水滴及孔内无气泡后,立即用酶标仪在 450nm 波长测量各孔的光密度(O.D.值)。

注意:



- 1、**试剂准备:**准备一次实验所需要的酶标条,其它的可从微孔板上拆下,密封,按照说明书要求保存,以备下次使用。
- 2、**加样:**实验操作中请使用一次性的吸头,避免交叉污染。加样时注意不要有气泡,将样品加于酶标板底部,尽量不触及孔壁,轻轻晃动混匀。加样或加试剂时,第一个孔

与最后一个孔加样之间的时间间隔如果太大，将会导致不同的“预温育”时间，从而明显地影响到测量值的准确性及重复性。因此，一次加样时间（包括标准品及所有样品）最好控制在 10 分钟内。推荐设置复孔进行实验。

- 3、**温育：**为防止样品蒸发，实验时请将加上盖或覆膜的酶标板置于湿盒内，以避免液体蒸发，洗板后应尽快进行下步操作，任何时候都应避免酶标板处于干燥状态，同时应严格遵守给定的温育时间和温度。
- 4、**洗涤：**充分的洗涤非常重要，在每次洗涤过程中，都要将洗涤液完全甩干。洗涤过程中反应孔中残留的洗涤液应在滤纸上拍干，勿将滤纸直接放入反应孔中吸水，同时要消除板底残留的液体和手指印，避免影响最后的酶标仪读数。
- 5、**反应时间的控制：**加入底物后请定时观察反应孔的颜色变化（比如，每隔 10 分钟观察一次），如颜色较深，请提前加入终止液终止反应，避免反应过强从而影响酶标仪光密度读数。
- 6、**底物：**底物请避光保存，在储存和温育时避免强光直接照射。

洗板方法

- 1、手工洗板方法：将推荐的洗涤缓冲液至少 0.35mL 注入孔内，浸泡 1-2 分钟，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；根据需要，重复此过程数次。
- 2、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。

计算

各标准品及样本 O.D. 值扣除空白孔 O.D. 值后作图（七点图），如设置复孔，则应取其平均值计算。以标准品的浓度为纵坐标（对数坐标），O.D.值为横坐标（对数坐标），在对数坐标纸上绘出标准曲线（最佳方程式应依回归方程计算的 R^2 值来定，以 R^2 值越趋近于 1 为好）。推荐使用专业制作曲线软件进行分析，如 **curve expert 1.3**，根据样品O.D.值，由标准曲线查出相应的浓度，乘以稀释倍数；或用标准物的浓度与 O.D.值计算出标准曲线的回归方程式，将样品的 O.D.值代入方程式，计算出样品浓度，再乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。

检测范围：0.156 ng/mL - 10 ng/mL

最低检测限：0.038 ng/mL

此值为 20 个空白样品（即标准品稀释液）测定的平均值加三倍标准差所对应的浓度。

特异性

本试剂盒用于检测小鼠的 **FABP2**，灵敏度高，特异性好，且与其它相关蛋白无明显交叉反应。

典型数据

为了便于计算，尽管浓度为自变量而 O.D.值为因变量，我们绘图时仍采用标准品的 O.D.值作为横坐标(X 轴)，标准品的浓度为纵坐标(Y 轴)。同时为了试验结果的直观性，图中提供的是原始数据而非对数值。推荐使用对数值建立标准曲线图。由于实验操作条件的不同（如操作者、移液技术、洗板技术和温度条件等），标准曲线的 O.D.值会有所差异。所提供的标准曲线仅供参考，实验者需要根据自己的实验建立标准曲线。

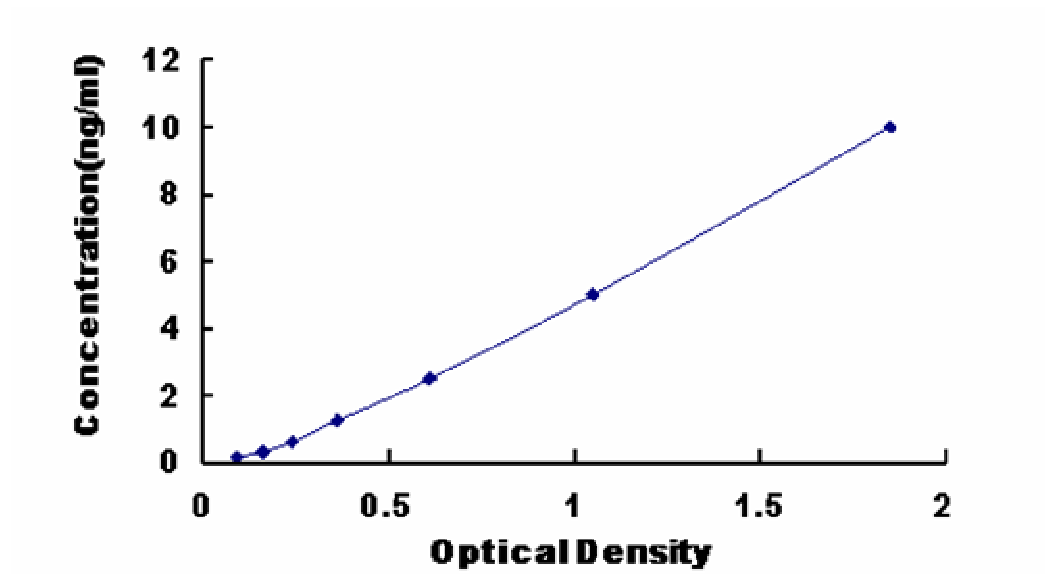


图 1：小鼠肠型脂肪酸结合蛋白(FABP2)试剂盒标准曲线

说明