

小鼠跨膜激活剂和钙调节剂及亲环蛋白配体相互作用因子

酶联免疫吸附测定试剂盒

产品编号: **MA1135** 规格: **96 次**

产品内容

| 产品组成 | 体积/数量 |
|--------------------|------------------|
| 小鼠 TACI 预包被板 | 8 孔条×12 个 |
| 样品稀释液 | 30 mL |
| 重组小鼠 TACI 标准品(冻干) | 2 支(10 ng/支) |
| 生物素标记小鼠 TACI 抗体 | 130 μL(效价 1:100) |
| 抗体稀释液 | 12 mL |
| 酶复合物(HRP 标记的链霉亲和素) | 130 μL(效价 1:100) |
| 酶复合物稀释液 | 12 mL |
| 浓缩洗涤液(25×) | 30 mL |
| 显色剂 TMB | 10 mL |
| 终止液 | 10 mL |
| 封板胶纸 | 4 张 |

产品简介

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法,用于检测样品中小鼠 TACI 的浓度。小鼠 TACI 捕获抗体已经预包被于酶标板上,当加入样品或标准品时,其中的小鼠 TACI 会与捕获抗体结合,而其它游离成分则会通过洗涤被除去。接着,再加入生物素标记的小鼠 TACI 抗体后,抗小鼠 TACI 抗体与小鼠 TACI 接合,形成夹心的免疫复合物,其它游离成分则通过洗涤被除去。随后加入酶复合物,生物素与酶复合物特异性结合,这样酶复合物上的 HRP 就与夹心的免疫复合物连接起来,而其它游离成分则通过洗涤被除去。最后加入显色剂,若样品中存在小鼠 TACI,则会形成免疫复合物,其上连接的 HRP 会催化无色的显色剂氧化生成蓝色物质,而后加入终止液,最终产物呈黄色。通过酶标仪检测,读取 450 nm 处的 OD 值,小鼠 TACI 浓度与 OD450 值之间呈正比,通过检测标准品绘制标准曲线,对照未知样品中 OD 值,即可计算出样品中小鼠 TACI 的浓度。

TACI(跨膜激活剂和钙调节剂及亲环蛋白配体相互作用因子, Transmembrane Activator and CAML Interactor, 又称 TNFRSF13B 或 CD267)是一种主要表达于 B 细胞、浆细胞及活化的 T 细胞表面的 III 型跨膜糖蛋白,属于肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRSF)成员,分子量约 32 kDa。其名称源于最初发现的两个相互作用蛋白:钙信号调节相关的 CAML(钙调磷酸酶相关蛋白)和亲环蛋白配体。TACI 通过与其配体 BAFF(B 细胞活化因子)和 APRIL(增殖诱导配体)结合,激活 NF-κB(经典和非经典通路)和 MAPK 信号,在 B 细胞稳态、类别转换重组(CSR)、浆细胞分化及 T 细胞非依赖性抗体应答中发挥关键调控作用;同时也可传递抑制性信号,防止 B 细胞过度活化和自身免疫反应。TACI 基因突变与常见变异型免疫缺陷病(CVID)和 IgA 缺乏症密切相关,患者表现为低丙种球蛋白血症、反复感染及自身免疫倾向;而 TACI 过表达或异常信号则与系统性红斑狼疮、多发性骨髓瘤等疾病的病理进程相关。靶向 TACI 或其配体的生物制剂(如 atacicept, TACI-Fc 融合蛋白)正在探索用于治疗自身免疫病和 B 细胞恶性肿瘤。



产品参数:

| | |
|------|------------------------|
| 检测范围 | 46.9 pg/mL~3,000 pg/mL |
| 敏感性 | 10 pg/mL |
| 特异性 | 系统和其它因子无交叉反应 |
| 样本类型 | 小鼠血清、血浆、体液、组织匀浆或细胞培养上清 |

使用方法

(一) 样品制备

1. 根据样品种类选择相应的处理方法:

(1) 细胞上清: 将细胞培养上清液100~500×g离心5min, 去除悬浮物后即可。

(2) 血清样品: 将全血在室温下静置0.5~2h, 待其自然凝固并析出血清后, 离心取黄色上清即可(4℃, 1,000~2,000×g, 10min), 注意请勿吸取沉淀, 制备好的血清需置于冰上待用, 请勿在其中添加任何防腐剂或抗凝剂;

(3) 血浆样品: 使用EDTA对全血进行抗凝处理后, 混合均匀置于冰上, 离心取黄色上清即可(4℃, 1,000~2,000×g, 10min), 注意请勿吸取沉淀, 制备好的血浆需置于冰上待用;

(4) 组织匀浆/体液: 离心去除沉淀即可。

注意:

①若待测样品无法及时检测, 样品制备完成后, 请分装冻存于-20℃, 避免反复冻融;

②请保证待测样品清澈透明, 检测前如发现样品中有悬浮物, 需通过离心去除;

③为了保证检测结果准确, 请勿使用溶血、黄疸、高血脂或污染的样品。

2. 稀释样品

查阅相关文献, 预估样品中待测因子的含量, 从而确定适当的稀释倍数, 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。根据待测因子含量的不同, 分别采取不同的稀释方案:

(1) 待测因子含量在 30~300 ng/mL 范围内, 一般按 1:100 稀释, 即向 297 μL 样品稀释液中加入3 μL 样品;

(2) 待测因子含量在 3~30 ng/mL 范围内, 一般按 1:10 稀释, 即向 225 μL 样品稀释液中加入25 μL 样品;

(3) 待测因子含量在 46.9~3,000 pg/mL 范围内, 一般按 1:2 稀释, 即向 100 μL 样品稀释液中加入 100 μL 样品;

(4) 待测因子含量≤46.9 pg/mL, 样品一般无需稀释。

以上方案仅供参考, 实验中请详细记录样品的稀释方法。

(二) 检测准备工作

3. 试剂盒自4℃冰箱取出后, 请置于室温平衡20min; 如从-20℃取出, 各组分需彻底融化后再平衡20min; 检测完成后, 剩余试剂请及时置于4℃或-20℃保存。



4.将浓缩洗涤液(25×)用双蒸水或去离子水稀释成1×洗涤液。

5.重组小鼠 TAC1 标准品的稀释和使用(在使用前2h内准备, 室温操作, 请严格控制在25~28℃)

(1) 配制 10 ng/mL 标准品: 取 1 mL 样品稀释液加入标准品管内, 盖好后静置 15 min 以上, 然后反复颠倒 / 搓动以助溶解;

(2) 配制 3,000 pg/mL 标准品: 取 300 μL 10 ng/mL 的标准品加入有 700 μL 样品稀释液的 EP 管中, 混匀, 做上标记;

(3) 按下表将 3,000 pg/mL 标准品用样品稀释液进行倍比梯度稀释。(最高浓度为 3,000 pg/mL, 将标准品稀释液作为浓度 0 pg/mL。)

| 管号 | 稀释液用量(μL) | 复溶后标准品用量(μL) | 标准品的最终浓度(pg/mL) |
|----|-----------|--------------|-----------------|
| A | 0 | 1000 | 3,000 |
| B | 300 | 300(从A管取出) | 1,500 |
| C | 300 | 300(从B管取出) | 750 |
| D | 300 | 300(从C管取出) | 375 |
| E | 300 | 300(从D管取出) | 187.5 |
| F | 300 | 300(从E管取出) | 93.75 |
| G | 300 | 300(从F管取出) | 46.9 |
| H | 300 | 0 | 0 |

注意: 标准品复溶加样后, 剩余部分请丢弃。

6.准备生物素标记小鼠 TAC1 抗体工作液 (需在使用前 1 h 内准备)

(1) 按每孔需添加100μL抗体工作液, 计算其总用量(为弥补操作中的损耗, 需多配制100~200μL);

(2)按1μL生物素标记小鼠 TAC1 抗体添加99μL抗体稀释液的比例配制工作液, 轻轻混匀。

7. 准备酶复合物工作液 (需在使用前 1 h 内准备)

(1) 按每孔需添加 100 μL 酶复合物工作液, 计算其总用量 (为弥补操作中的损耗, 需多配制100~200 μL);

(2) 按 1 μL 酶复合物 添加 99 μL 酶复合物稀释液 的比例配制工作液, 轻轻混匀。

(三) 检测流程

8.通过计算确定一次实验所需的板条数, 取出所需板条放置于框架内, 多余的板条请放回铝箔袋密封, 保存于4℃或-20℃。

注意:

①标准品和样品建议做双复孔检测;

②每次实验均需绘制标准曲线。

9.将用样品稀释液稀释后的样品和不同浓度标准品(100μL/孔)分别加入相应孔中, 用封板胶纸封住反应孔, 37℃孵育90min。

注意:

①请查阅相关文献确定样品中待检测蛋白的大致浓度, 若其大于本试剂盒标准曲线的最大标准品浓度, 请将样品适当稀释后再进行检测;

②整个加样过程不宜超过10min, 否则可能会影响检测结果。

10.甩去酶标板内液体, 无需洗板, 将板倒扣在吸水纸上拍干。



- 11.加入稀释后的生物素标记小鼠 TAC1 抗体工作液(100 μ L/孔), 用封板胶纸封住反应孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育60min。
- 12.洗板5次, 每孔1 \times 洗涤液用量为300 μ L, 注入与吸出间隔15~30s, 洗完后将板倒扣在吸水纸上拍干。
注意: 洗涤过程至关重要, 洗涤不充分会导致结果产生较大误差。
- 13.加入稀释后的酶复合物 (100 μ L/ 孔), 用封板胶纸封住反应孔, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min;
- 14.洗板 5 次, 方法同步骤 12;
- 15.加入显色剂 TMB(100 μ L/ 孔), 用封板胶纸封住反应孔, 避光 37 $^{\circ}$ C 反应 10~25 min。
注意:
① 在保存和使用时, 请勿将 TMB 接触氧化剂和金属;
② 因实验室条件差异, 最佳显色时间会有所不同, 反应充分时肉眼可见标准品的前 3~4 孔有明显的梯度蓝色。
- 16.加入终止液(100 μ L/孔), 混匀后即刻使用酶标仪测量OD450, 同时设定540nm或570nm 作为校正波长, 即可计算得到校正吸光度值(OD450-OD540或OD450-OD570);
注意: 读取OD值建议在10min内完成。

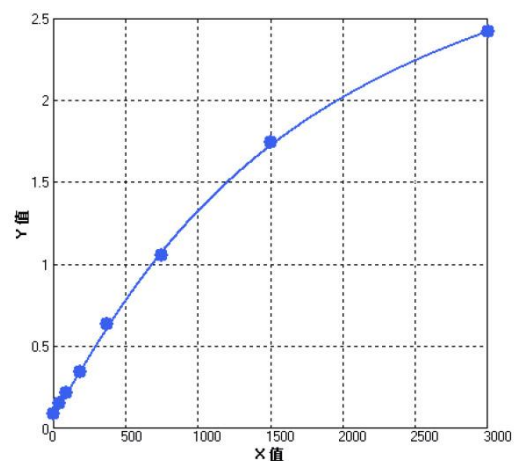
(四) 数据分析

- 17.绘制标准曲线。以标准品浓度作横坐标, OD值作纵坐标, 利用计算机软件作四参数逻辑(4-PL)曲线拟合创建标准曲线, 通过样品的OD值即可在标准曲线上计算出其相应浓度。
注意:
①复孔OD值在20%的差异范围内结果才有效, 复孔OD值取平均后可作为测量值;
②若样品OD值高于标准曲线上限, 应适当稀释后重测, 计算浓度时应乘以稀释倍数。

标准曲线范例

小鼠 TAC1 参考标准曲线

| 标准品浓度 | O.D. |
|-------------|-------|
| 0 pg/mL | 0.088 |
| 46.9 pg/mL | 0.155 |
| 93.8 pg/mL | 0.219 |
| 187.5 pg/mL | 0.343 |
| 375 pg/mL | 0.638 |
| 750 pg/mL | 1.058 |
| 1,500 pg/mL | 1.741 |
| 3,000 pg/mL | 2.418 |



注意: 本图仅供参考, 应以同次试验标准品所绘标准曲线计算样品含量。

保存条件

2~8 $^{\circ}$ C 保存, 自生产之日起6个月有效; 长期储存请置于-20 $^{\circ}$ C, 自生产之日起12个月有效。



注意事项

1. 浓缩洗涤液低温情况下可能会出现结晶，请水浴加热使结晶完全溶解后再配制工作液；
2. 严禁混用不同批号试剂盒的组分；
3. 加样过程请避免产生气泡，实验操作过程中一定要保证试剂充分混匀，否则会使结果产生较大误差；
4. 说明书中提到的室温条件，请严格控制在25~28℃；
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；
6. 本产品仅限科研使用。

S260301

