

Rat IL-17A ELISA Kit

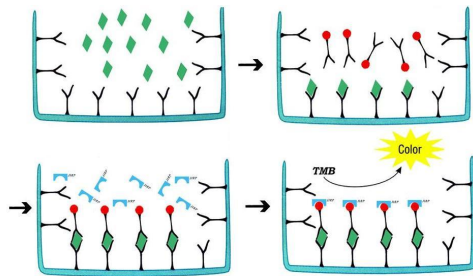
货号: BN51018

规格: 48T; 96T

本试剂盒用于定量检测大鼠血清、血浆或细胞培养上清液等样本中天然和重组 IL-17A 浓度。**使用前请仔细阅读说明书并检查试剂组分。**

检测原理:

本实验采用双抗体夹心 ELISA。用抗大鼠 IL-17A 单克隆抗体预包被酶标板, 加入适度稀释的样本和标准品, 其中的 IL-17A 会与其单抗结合, 洗去游离成分; 加入生物素化的抗大鼠 IL-17A 抗体, 抗大鼠 IL-17A 抗体与结合在单抗上的大鼠 IL-17A 结合而形成免疫复合物, 洗去游离的成分; 加入辣根过氧化物酶标记的亲合素, 生物素与亲合素特异性结合, 洗去未结合的酶结合物; 加入显色剂, 若反应孔中有 IL-17A, 辣根过氧化物酶会使无色的显色剂现蓝色; 加终止液变黄。在 450nm 下测 OD 值, IL-17A 浓度与 OD450 值之间呈正比, 可通过绘制标准曲线计算出标本中 IL-17A 浓度。



检测原理示意图

试剂盒组成:

| 试剂盒组成 | 96t | 48t | 配制 |
|----------------|------|-----|-----------|
| 1a 标准品 | 2 支 | 1 支 | 按说明书进行稀释 |
| 1b 标准品和标本稀释液 | 1 瓶 | 1 瓶 | 即用型 |
| 2a 浓缩生物素化抗体 | 2 支 | 1 支 | 按瓶签标识进行稀释 |
| 2b 生物素化抗体稀释液 | 1 瓶 | 1 瓶 | 即用型 |
| 3a 浓缩酶结合物 (避光) | 2 支 | 1 支 | 按瓶签标识进行稀释 |
| 3b 酶结合物稀释液 | 1 瓶 | 1 瓶 | 即用型 |
| 4 浓缩洗涤液 20× | 1 瓶 | 1 瓶 | 按瓶签标识进行稀释 |
| 显色剂 (避光) | 1 瓶 | 1 瓶 | 即用型 |
| 终止液 | 1 瓶 | 1 瓶 | 即用型 |
| 抗体包被板条 | 8×12 | 8×6 | 即用型 |

| | | | |
|------|-----|-----|-----|
| 封板胶纸 | 4 张 | 2 张 | 即用型 |
| 说明书 | 1 份 | 1 份 | |

储存条件:

| | | |
|---|--|---|
| 未启封的试剂盒 | 4℃ 保存, 请于保质期内使用。 | |
| 已 启 封 或 重 新 溶 解 的 试 剂 | 1b 标准品和标本稀释液 | 可以整盒放入 4℃ 储存 1 个月。 2a 浓缩生物素化抗体和 3a 浓缩酶结合物需用现配。 |
| | 2a 浓缩生物素化抗体 (100×) | |
| | 2b 生物素化抗体稀释液 | |
| | 3a 浓缩酶结合物 (避光 100×) | |
| | 3b 酶结合物稀释液 | |
| 4 浓缩洗涤液 20× | | |
| 显色剂 (避光) | | |
| 终止液 | 4℃ 或常温保存 | |
| 标准品 | 重溶后分装, -20℃ 存放一个月, 避免反复冻融。稀释后的标准品使用后应丢弃, 不得重复使用。 | |
| 抗体包被板条 | 实验中不用的板条应立即放回包装袋中, 密封干燥 4℃ 保存。 | |

以上储存条件均要求在试剂盒保质期内。

其它实验材料(不提供, 但可协助购买):

- 酶标仪(450nm)
- 高精度可调移液器及吸头: 0.5-10, 2-20, 20-200, 200-1000 μ l。
一次检测样品较多时, 最好用多通道移液器。
- 自动洗板机或洗瓶
- 37℃ 温箱
- 双蒸水或去离子水
- 坐标纸
- 量筒

注意事项:

- 试剂盒保存在 2-8℃, 除复溶后的标准品, 其它成分不可冷冻。
- 浓缩生物素化抗体(2a)、浓缩酶结合物(3a)装量极少, 运输中颠簸和可能的倒置会使液体沾到管壁或瓶盖。使用前请离心处理以使附着于管壁或瓶盖的液体沉积到管底。
- 不同批号试剂不可混用。**
- 为避免交叉污染请使用一次性吸头。
- 终止液和显色剂具腐蚀性, 避免皮肤及粘膜直接接触, 一旦接触到这些液体, 请尽快用大量水冲洗。
- 使用干净的塑料容器配制洗涤液, 使用前充分混匀试剂盒里的各种成份及样品。

本产品仅用于科研

7. 洗涤酶标板时应充分拍干, 不要将吸水纸直接放入酶标反应孔中吸水。
8. 不要用其它来源的试剂混合或替代该产品的组分, 不同批号的试剂盒组份不能混用, 请在有效期内使用本产品。
9. 在试验中标准品和样本检测时建议作双复孔或三复孔, 加入试剂的顺序应一致, 以保证所有反应孔孵育的时间一样。
10. 充分混匀对反应结果尤为重要, 最好使用微量振荡器(使用最低频率进行振荡)。
11. 避免操作过程中酶标板干燥, 干燥会使酶标板上生物成分迅速失活, 影响实验结果。
12. 适当的稀释样品, 使样品值落在标准曲线范围内, 根据待测因子含量高、中、低的不同, 建议采用1:100、1:10、1:2稀释样品。如果样品OD值高于最高标准, 适当增加稀释度并重复检测。
13. 标准品稀释液, 操作人, 移液方式, 洗涤方法, 孵育时间及温度, 试剂盒批次的不同均可能会导致结果的差异。
14. 此法可有效的消除可溶性受体、结合蛋白以及生物样品中的其他因素的干扰。

样品收集、处理及保存方法:

1. **血清:** 使用不含热原和内毒素的试管, 收集血液后, 室温凝血30min, 1000×g离心10min, 小心分离血清。
2. **血浆:** 用EDTA、柠檬酸盐、肝素作为抗凝剂收集血浆, 收集后30min内以1000×g离心15min去除颗粒。
3. **细胞上清液:** 1000×g离心10min去除颗粒和聚合物。
4. **保存:** 若样品不立即检测, 请将其按一次用量分装, -20℃—-70℃保存, 避免反复冻融。尽量避免使用溶血或高血脂样本。如果血清中含有大量颗粒, 检测前先离心或过滤去除; 室温下解冻, 请勿于37℃或更高的温度加热解冻。
5. **稀释:** 可根据实际情况, 将标本做适当倍数稀释(建议做预实验, 以确定稀释倍数)。

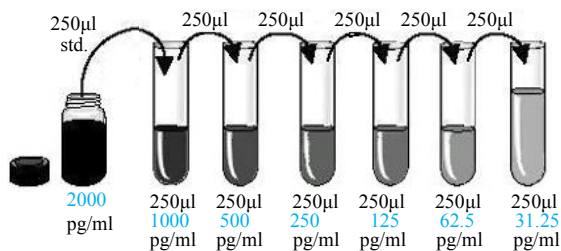
注: 正常大鼠血清或血浆样本建议做1:2稀释。

试剂准备:

1. 提前30min从冰箱中取出试剂盒, 平衡至室温。
2. **洗涤缓冲液:** 从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶, 这属于正常现象, 加热并轻轻摇晃使结晶完全溶解后再配制。将浓缩洗涤液用双蒸水稀释(1:20)。未用完的放回4℃。
3. **标准品:** 加入标准品/标本稀释液(1b)0.5 ml至冻干标准品(1a)中, 待彻底溶解后, 静置15分钟混匀(浓度为2000pg/ml), 然后根据需要稀释, 见下图(建议标准曲线使用以下浓度: 2000、1000、500、250、125、62.5、31.25、0 pg/ml)。稀释的标准品不得重

复使用, 未用完的标准品应按照一次用量分装后, 将其放在-20~-70℃贮存, 一次性使用, 避免反复冻融。

标准品稀释方法:



4. **生物素化抗体工作液:** 根据每孔需要100µl来计算总的用量, 多配制100-200µl。以生物素化抗体稀释液(2b)稀释浓缩生物素化抗体(2a)(1:100)。最好现用现配。(稀释方法参照下表)
5. **酶结合物工作液:** 以酶结合物稀释液(3b)稀释浓缩酶结合物(3a)(1:100)。最好现用现配。(稀释方法参照下表)

浓缩生物素化抗体稀释方法

| 所用板条数 | 浓缩生物素化抗体 | + | 生物素化抗体稀释液 |
|-------|----------|---|-----------|
| 12 | 110µL | + | 10890µL |
| 10 | 90µL | + | 8910µL |
| 8 | 70µL | + | 6930µL |
| 6 | 50µL | + | 4950µL |
| 4 | 33µL | + | 3267µL |
| 2 | 17µL | + | 1683µL |
| 1 | 9µL | + | 891µL |

浓缩酶结合物稀释方法

| 所用板条数 | 浓缩酶结合物 | + | 酶结合物稀释液 |
|-------|--------|---|---------|
| 12 | 110µL | + | 10890µL |
| 10 | 90µL | + | 8910µL |
| 8 | 70µL | + | 6930µL |
| 6 | 50µL | + | 4950µL |
| 4 | 33µL | + | 3267µL |
| 2 | 17µL | + | 1683µL |
| 1 | 9µL | + | 891µL |

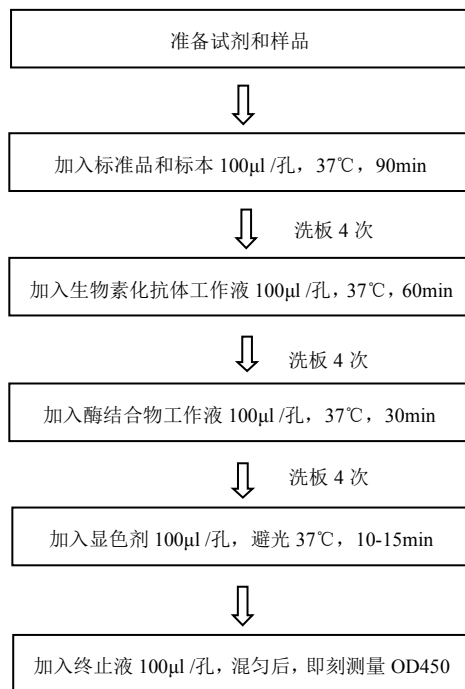
操作步骤:

1. 按照上述准备工作配制好各种溶液。
2. 根据待测样品数量和标准品的数量决定所需的板条数, 并增加1孔作为空白对照孔。分别将标本和不同浓度标准品(100µl/孔)加入相应孔中(零孔只加标准品/样本稀释液), 用封板胶纸封住反应孔, 37℃孵育90分钟(空白对照孔除外)。
3. 洗板4次: (1)自动洗板机: 要求注入的洗涤液为350µl, 注入与吸出间隔15-30秒。(2)手工洗板: 甩尽孔内液体, 每孔加洗涤液350µl, 静置30秒后甩尽液体, 在厚迭吸水纸上拍干。

本产品仅用于科研

- 加入生物素化抗体工作液(100 μ l/孔)。用封板胶纸封住反应孔，37 $^{\circ}$ C孵箱孵育60分钟（空白对照孔除外）。
- 洗板4次。
- 加入酶结合物工作液(100 μ l/孔)。用封板胶纸封住反应孔，37 $^{\circ}$ C孵箱孵育30分钟（空白对照孔除外）。
- 洗板4次。
- 加入显色剂100 μ l/孔，避光，37 $^{\circ}$ C孵箱孵育10-15分钟。加入终止液 100 μ l/孔，混匀后立即测量 OD450 值(5 分钟内)。

操作流程图:



操作要点提示:

- 配制各种试剂时要充分混匀，但要避免产生大量泡沫，以免加样时加入大量的气泡，产生加样误差。
- 为避免交叉污染，在加入不同浓度的标准品、不同样品、不同试剂时谨记及时更换吸头。
- 为了确保准确的结果，在每次孵育前均需使用新封板胶纸封住反应孔。
- 显色剂在添加之前，应保持无色，请勿使用已变为蓝色的显色溶液。最佳显色时间对标准曲线很重要，肉眼可见前 3-4 孔有梯度蓝色，后 3-4 孔差别不明显，零孔无蓝色出现即可终止。
- 每次检测均要做标准曲线，根据样品待测因子的含量，适当稀释或浓缩样本，最好做预实验。

结果判断:

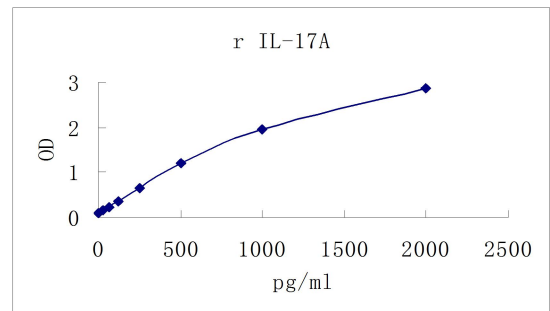
- 每个标准品和标本的OD值应减去空白孔的OD值，如果做复孔，

求其平均值。

- 使用计算机软件以吸光度OD值为纵坐标(Y)，相应的IL-17A标准品浓度为横坐标(X)，生成相应的标准曲线，样品的IL-2含量可根据其OD值由标准曲线换算出相应的浓度。
- 若标本 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算标本含量。
- 参考数据:

| 标准品浓度 (pg/ml) | OD值1 | OD值2 | 平均值 | 矫正值 |
|---------------|-------|-------|-------|-------|
| 0 | 0.087 | 0.086 | 0.087 | --- |
| 31.25 | 0.171 | 0.173 | 0.172 | 0.085 |
| 62.5 | 0.248 | 0.239 | 0.244 | 0.157 |
| 125 | 0.364 | 0.362 | 0.363 | 0.276 |
| 250 | 0.664 | 0.668 | 0.666 | 0.579 |
| 500 | 1.204 | 1.21 | 1.207 | 1.120 |
| 1000 | 1.968 | 1.963 | 1.966 | 1.879 |
| 2000 | 2.856 | 2.857 | 2.857 | 2.770 |

数据仅供参考，不同用户最佳显色时间会有所不同



本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线为准

结果重复性:

板间，板内变异系数均<10%。

灵敏度:

最低检测大鼠 IL-17A 剂量小于 15 pg/ml。最低检出量测定方法：20 个零标准的平均 OD 值增加两个标准差，再计算相应的浓度。

ELISA检测常见问题分析及解决办法:

| 问题 | 可能原因 | 解决办法 | |
|-------------------|--------------------|--|----------------------------|
| 无颜色 | 不同试剂盒或不同批号的试剂混合 | 重新检查试剂的标签, 确保所有组分都属于正使用的试剂盒中的。不能混用不同试剂盒或不同批号的试剂。 | |
| | 漏加酶 | 检查操作流程, 注意不要漏加 | |
| | HRP 酶污染了叠氮钠 | 使用新配制的试剂, 禁含叠氮钠 | |
| | 试剂配制/使用有误 | 重做试验, 严格按说明书操作, 每次配制和使用前看清标签 | |
| 显色弱 | 超过有效期的产品可能会产生很弱的信号 | 检查产品有效期 | |
| | 缩短孵育时间能使实验信号变弱 | 检查孵育时间 | |
| | 使用了被污染的试剂 | 检查试剂是否被污染 | |
| | 仪器设定不正确, 滤光片不匹配 | 仪器是否设定正确, 滤光片的使用等 | |
| | 洗涤操作不规范 | 洗涤不充分, 使用手工洗板常出现 | 洗瓶洗涤, 每孔应完全充满洗涤缓冲液, 倾出时应迅速 |
| | | 若用洗板机, 应校准并设定足够充满每孔的体积量。板内侧不应接触设备 | 检查每孔是否有残留的洗液或每孔加样量的体积是否准确 |
| 可在两次洗板之间加 30 秒的浸泡 | | | |
| 高背景 | 实验中孵育温度和时间不适当 | 确定每一试验步骤的孵育温度和时间是否适当 | |
| | 酶加量过多 | 加酶前验看移液器调节量是否准确 | |
| | | 检查稀释度, 若必要进行效价测定 | |

储存条件:

| 未启封的试剂盒 | | 4℃保存, 请于保质期内使用。 |
|-------------|---------------------|---|
| 已启封或重新溶解的试剂 | 1b 标准品和标本稀释液 | 可以整盒放入 4℃ 储存 1 个月。 2a 浓缩生物素化抗体和 3a 浓缩酶结合物需用现配。 |
| | 2a 浓缩生物素化抗体 (100×) | |
| | 2b 生物素化抗体稀释液 | |
| | 3a 浓缩酶结合物 (避光 100×) | |
| | 3b 酶结合物稀释液 | |
| | 4 浓缩洗涤液 20× | |
| | 显色剂 (避光) | |
| | 终止液 | 4℃或常温保存 |
| | 标准品 | 重溶后分装, -20℃存放一个月, 避免反复冻融。稀释后的标准品使用后应丢弃, 不得重复使用。 |
| | 抗体包被板条 | 实验中不用的板条应立即放回包装袋中, 密封干燥 4℃ 保存。 |

以上储存条件均要求在试剂盒保质期内。