

人磷酸化Tau蛋白(TAU pT231)

ELISA试剂盒说明书

产品编号：TD-BK1501

包装规格：96 TESTS

声明

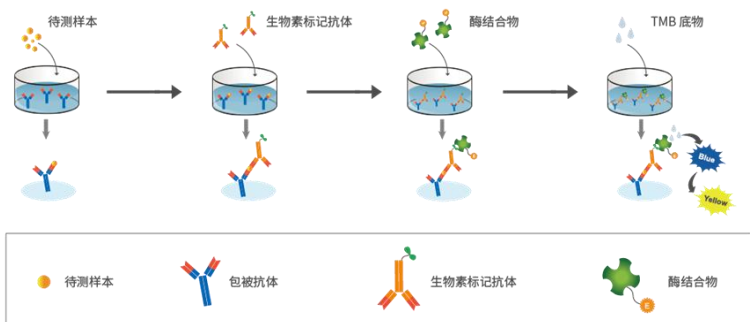
使用前仔细阅读本说明书。只能用于研究用途，不得用于医学诊断。

用途

用于人血清、血浆或其他相关生物液体中磷酸化 Tau pT231蛋白的测定。

工作原理

本试剂盒采用的是双抗夹心酶联免疫吸附检测技术（ELISA）。测定样品中人磷酸化 Tau pT231蛋白水平。向预先包被了抗人磷酸化Tau pT231 蛋白抗体的酶标孔中，加入标准品和样本，温育后，加入生物素标记的抗磷酸化 Tau pT231 蛋白抗体。再与 HRP 标记的链霉亲和素结合，形成免疫复合物，再经过温育和洗涤，去除未结合的酶，然后加入显色底物 TMB，产生蓝色，并在酸的作用下转化成最终的黄色。最后，在 450 nm 处测定反应孔样品吸光度（OD）值，样本中的人磷酸化Tau pT231蛋白浓度与 OD 值成正比，通过绘制标准曲线计算出样本中人磷酸化Tau pT231 蛋白的浓度。

原理图：

试剂盒组成

试剂盒组成	48 孔配置	96 孔配置	保存
说明书	1 份	1 份	
封板膜	5 片	5 片	
预包被酶标板	8 孔 X 6 条	8 孔 X 12 条	-20°C
标准品	1 瓶	2 瓶	-20°C
标准品/样本稀释液 SD1	20 mL X 1 瓶	20 mL X 1 瓶	2-8°C
浓缩生物素标记磷酸化 Tau pT231 蛋白 抗体 (100X)	60 μ l	120 μ l	-20°C
生物素标记抗体稀释液 SD2	14 mL X 1 瓶	14 mL X 1 瓶	2-8°C
浓缩 HRP 标记链霉亲和素 (100X)	60 μ l	120 μ l	-20°C (避光)

HRP 标记链霉亲和素稀释液 SD3	14 mL X 1 瓶	14 mL X 1 瓶	2-8°C
显色剂	10 mL X 1 瓶	10 mL X 1 瓶	2-8°C （避光）
终止液	10 mL X 1 瓶	10 mL X 1 瓶	2-8°C
浓缩洗涤液（25×）	30 mL X 1 瓶	30 mL X 1 瓶	2-8°C

需要而未提供的试剂和器材

1. 37°C 恒温箱
2. 酶标仪（450 nm 波长滤光片）
3. 精密移液器及一次性吸头
4. 去离子水或蒸馏水
5. 一次性试管
6. 洗板机或洗瓶，吸水纸

注意事项

1. 试剂盒应在有效期内使用，请不要使用过期的试剂。不同批次的试剂盒组分不能混用。
2. 试剂盒未使用时应按各组分标签温度分开保存。
3. 试剂盒使用前请在室温恢复 20 min，且充分混匀试剂盒里的各种成份及制备的样品。
4. 在试验中标准品和样本建议作复孔检测，且加入试剂的顺序应保持一致。
5. 为避免交叉污染，请在试验中使用 1 一次性试管，枪头，封板膜及洁净塑料容器。
6. 浓缩生物素标记抗体和浓缩 HRP 标记链霉亲和素的体积较少，在运输过程中微量液体会沾到管壁及瓶盖上，使用前请离心处理（5-10 s 即可），使管壁上的液体集中在管底部，取用时，请用移液器小心吹打几次。
7. 为保证结果准确，每次检测均需做标准曲线。请勿重复使用已稀释过的标准品、浓缩生物素标记抗体、浓缩 HRP 标记链霉亲和素。
8. 试剂盒中的终止液为酸性溶液，操作人员在使用时请戴上手套并注意防护；在操作过程中也要

避免试剂接触皮肤和眼睛，如果不慎接触，请用大量清水清洗；检测血液样本及其它体液样本时，请按国家生物实验室安全防护有关管理规定执行。

样本收集及储存

1. 细胞培养上清:

将细胞培养基移至无菌离心管，在 4°C 条件下 1000 X g 离心 20 min，除去杂质及细胞碎片。取上清检测。

2. 血清样本:

室温下血液自然凝固后，在 4°C 条件下 1000 X g 离心 20 min，取上清即可检测。

3. 血浆样本:

将全血收集到含抗凝剂的管中，抗凝剂推荐使用 EDTA 钠盐，样品采集后 30 min 内于 1000 X g 离心 15 min，取上清即可检测。避免使用溶血，高血脂样品。

4. 组织匀浆: 用预冷的 PBS (0.01 M, pH=7.4) 冲洗组织，去除残留血液，称重后将组织剪碎。

将剪碎的组织与对应体积的 PBS (一般按 1:9 的重量体积比，比如 1 g 的组织样品对应 9 mL 的 PBS，具体体积可根据实验需要适当调整，并做好记录。推荐在 PBS 中加入蛋白酶抑制剂) 加入玻璃匀浆器中，在冰上充分研磨。为了进一步裂解组织细胞，可以对匀浆液进行超声破碎。最后将匀浆液 5000 X g 离心 5-10 min，取上清检测。

5. 细胞提取液: 贴壁细胞用冷的 PBS 轻轻清洗，然后用胰蛋白酶消化，1000 X g 离心 5 min 后收集细胞；悬浮细胞可直接离心收集。收集的细胞用冷的 PBS 洗涤 3 次。每 1×10^6 个细胞中加入 150-200 μ l PBS 重悬并通过反复冻融使细胞破碎(若含量很低可减少 PBS 的体积)。将提取液于 1500 X g 离心 10 min，取上清检测。

※注意:

1. 样品收集后若在 1 周内进行检测的可保存于 4°C，若不能及时检测，请按一次使用量分装，冻存于 -20°C (1 个月内检测)，或 -80°C (3 个月内检测)，避免反复冻融。
2. 试剂盒检测范围不等同于样本的浓度范围，如果您的样品中检测物浓度高于标准品最高值，

请根据实际情况，做适当倍数稀释（建议查阅文献后先做预实验，以确定稀释倍数）。

3. 若所检样本不在说明书所列样本之中，建议做预实验验证其检测有效性。
4. 若使用化学裂解液制备组织匀浆或细胞提取液，由于引入某些化学物质会导致 ELISA 测值出现偏差。
5. 某些重组蛋白可能与试剂盒中捕获或检测抗体不匹配而出现不能检测的情况。

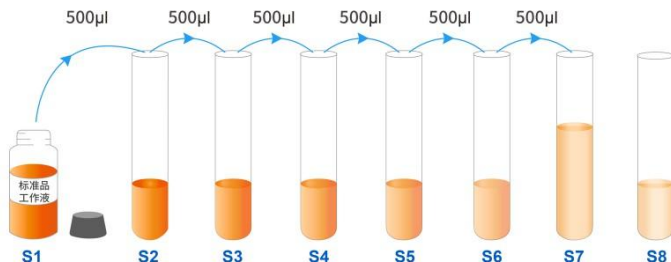
试剂准备

1. 试剂回温：在实验前 20 min 将试剂盒、待测样本放置于室温下。读数前 15 min 打开酶标仪预热。
2. 配制洗涤液：预先计算好稀释后的洗涤液使用体积，然后用双蒸水或去离子水将 25 倍浓缩洗涤液稀释成 1 倍应用液。

提示：从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶，属于正常现象，可用 40℃ 水浴微加热使结晶完全溶解后再配制洗涤液。当日使用。

3. 标准品梯度稀释：标准品于 10000 X g 离心 1 min，加入标准品&样品稀释液 1.0 mL 至冻干标准品中，旋紧管盖，静置 10 min，上下颠倒数次，待其充分溶解后，轻轻混匀，配成 2000 pg/mL 的标准品工作液。然后根据需要进行稀释。建议配制以下浓度：2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 0 pg/mL。倍比稀释方法：取 7 支 EP 管，每管中加入 500 μl 标准品&样品稀释液，从 2000 pg/mL 的标准品工作液中吸取 500 μl 到其中一支 EP 管中混匀配成 1000 pg/mL 的标准品工作液，按此步骤往后依次吸取混匀。具体稀释如下图 S1-S8。

提示：最后一管直接作为空白孔，不需要再从倒数第二管中吸取液体。



4. 生物素标记抗体工作液：预先计算好试验所需用量(以100 μl /孔计算)，用稀释液SD2将100倍生物素标记抗体浓缩液稀释成1倍工作液（稀释前充分混匀），请在30 min内加入到反应孔中。
5. HRP 标记链霉亲和素：按每次试验所需用量配制(以100 μl /孔计算)，用稀释液SD3将100倍浓缩HRP 标记链霉亲和素稀释成1倍应用工作液（稀释前离心），请在30 min内使用。
6. 洗涤方法：

- 自动洗板：甩尽酶标板孔中液体，在厚迭吸水纸上拍干，注入洗涤液为 350 μl /孔,注入与吸出间隔为 30 s，洗板 5 次。

- 手工洗板：甩尽酶标板孔中液体，在厚迭吸水纸上拍干，用洗瓶加入洗涤液 350 μl /孔，静止 1-2 min 后甩净酶标板孔中液体，在厚迭的吸水纸上拍干，洗板 5 次。

操作程序

※正式测定前请务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

1. 预先计算好所需的板条数，实验前 30 min，拿出试剂盒，恢复至室温。
2. 每个反应孔中加入 100 μ l 标准品工作液及检测样本（若样本浓度高于检测范围，需用标准品&样本稀释液稀释后取样），标准品需做复孔，封板后于 37°C 孵箱孵育 90 min。

提示：加样时将样品加于酶标板底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀，避免产生气泡。加样时间控制在 10 min 内。

3. 弃去液体，甩干，每个反应孔中加入 100 μ l 生物素标记磷酸化 Tau pT231 蛋白抗体工作液至反应孔中，封板后于 37°C 孵箱孵育 60 min。
4. 洗涤：弃去液体，甩干，每个反应孔中加入 350 μ l 洗涤液，浸泡 1-2 min，甩干洗涤液。重复 4 次。
5. 每个反应孔中加入 100 μ l HRP 标记链霉亲和素工作液至反应孔中，封板后于 37°C 孵箱孵育 30 min。
6. 洗涤：每个反应孔中加入 300 μ l 洗涤液，间隔 30 s，甩干洗涤液。重复 4 次。
7. 每个反应孔中加入 90 μ l 显色剂（避光）至反应孔中，封板后于 37°C 避光显色 15 min 左右。
8. 每个反应孔中加入 50 μ l 终止液，即刻用酶标仪 450 nm 波长下测量 OD 值（5 min 内）。
9. 用酶标仪 450 nm 波长测定 OD 值。
10. 计算标准品、样品的平均 OD 值：每个标准品和样品的 OD 值应减去零孔的 OD 值。
11. 以标准品浓度为横坐标，吸光度 OD 值为纵坐标，用“四参数 logistics 模型”绘制标准曲线。（作图时去掉空白组的值）
12. 若样本 OD 值高于标准曲线上限，应做适当稀释后重新检测，计算浓度时再乘以稀释倍数。

灵敏度

最低可检测浓度达 18.75 pg/mL。

检测范围

31.25~2000 pg/mL

特异性

可检测样本中的人磷酸化 Tau pT231蛋白，且与其类似物无明显交叉反应。

常见问题

问题	可能原因	解决方法
标准曲线梯度差	吸液或加液不准	检查移液器及吸头
	标准品稀释不正确	溶解标准品时稍微旋转瓶身，轻轻混匀使粉末完全溶解
	洗涤不完全	保证洗涤时间和洗涤次数及每孔的加液量
显色很弱或无色	孵育时间太短	保证充足的孵育时间
	实验温度不正确	使用推荐的实验温度
	试剂体积不够或漏加	检查吸液及加液过程，保证所有试剂按顺序足量添加
	稀释不正确	检查吸液及加液过程，保证所有试剂按顺序足量添加
	酶标记物失活或底物失效	混合酶结合物和底物，通过迅速显色来检查判断
读数数值低	酶标仪设置不正确	在酶标仪上检查波长及滤光片设置
		提前打开酶标仪预热
变异系数大	加液不正确	检查加液情况
背景值高	检测抗体的工作浓度过高	使用推荐的稀释倍数
	酶标板洗涤不完全	保证每步清洗完全；如果用自动洗板机，请检查所有的出口是否有堵塞；是否使用试剂盒配备的洗涤液
	洗液有污染	配制新鲜的洗液
灵敏度低	ELISA 试剂盒保存不当	按说明书要求保存相关试剂
	读数前未终止	OD 读数前应在每孔中加入终止液