小鼠B细胞刺激因子(BAFF)定量分析酶联免疫检测试剂盒 货号：EKM104-P

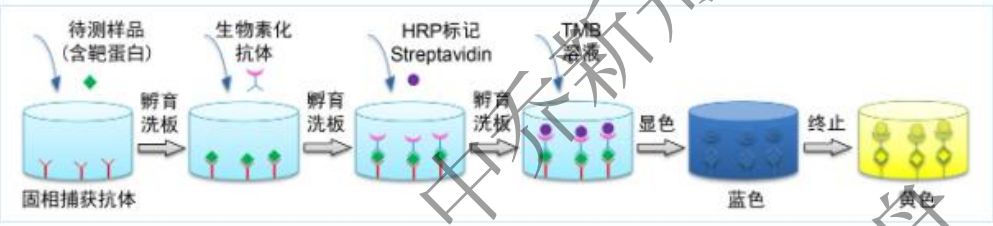
本试剂盒仅供科研使用。用于体外定量检测小鼠血清、血浆或细胞培养上清液中的BAFF浓度。**使用前请仔细阅读说明书并检查试剂组分是否完整。**如有产品包装破损或质量投诉，请在收到货一个月之内联系我们。如有其它疑问请登录中乔新舟公司网站或致电本公司。

1、BAFF 简介：

B细胞刺激因子（BAFF），也叫BLyS, TALL-1和THANK，是TNF超家族成员之一，因为能够维持和活化B细胞而得名。B细胞刺激因子前体蛋白是一个32 kDa的II型跨膜蛋白。血液中能检测的部分是一个182个氨基酸的蛋白，是B细胞刺激因子胞外部分。

2、检测原理:

本试剂盒采用双抗体夹心ELISA法检测样本中BAFF的浓度。BAFF捕获抗体已预包被于酶标板上，当加入标本或参考品时，其中的BAFF会与捕获抗体结合，其它游离的成分通过洗涤的过程被除去。当加入生物素化的抗小鼠BAFF抗体后，抗小鼠BAFF抗体与BAFF接合，形成夹心的免疫复合物，其它游离的成分通过洗涤的过程被除去。随后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，亲合素连接的酶就会与夹心的免疫复合物连接起来；其它游离的成分通过洗涤的过程被除去。最后加入显色剂，若样本中存在BAFF将会形成免疫复合物，辣根过氧化物酶会催化无色的显色剂氧化成蓝色物质，在加入终止液后呈黄色。通过酶标仪检测，读其450nm处的OD值，BAFF浓度与OD450值之间呈正比，通过参考品绘制标准曲线，对照未知样本中OD值，即可算出标本中BAFF浓度。



双抗体夹心ELISA原理图

3、小鼠BAFF定量分析酶联免疫检测试剂盒组成:

组分	规格（96T）
小鼠BAFF预包被板	12条
样本分析缓冲液	5ml
标准品稀释液	10ml

小鼠BAFF标准品	2-4支(冻干)
小鼠BAFF生物素化抗体	10ml
亲和素连接的HRP酶	10ml
浓缩洗涤液 20×	30ml
TMB底物	10ml
中止液	5ml
封板胶纸	3张
说明书	1份

4、实验过程需自备的材料:

1.不同规格的加样枪及相应的枪头；2.酶标仪；3.自动洗板机；4.去离子水或双蒸水；

标本收集:

1.标本的收集请按下列流程进行操作；

A.细胞上清标本离心去除悬浮物后即可；

B.血清标本应是自然凝固后，取上清，避免在冰箱中凝固血液；

C.血浆标本，推荐用EDTA的方法收集

D.若待测样本不能及时检测，标本收集后请分装，冻存于－20℃，避免反复冻融。

2.血清标本不应添加任何防腐剂或抗凝剂；

3.标本应清澈透明，检测前样本中如有悬浮物应通过离心去除。

4.请勿使用溶血，高血脂或污染的标本检测，否则结果将不准确。

注：小鼠血清或血浆样本请用样本分析缓冲液做倍比稀释后再检测。

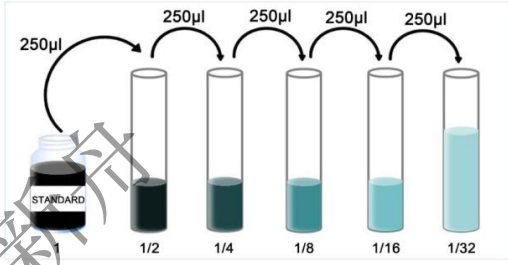
5、检测前准备工作:

1.试剂盒自冰箱中取出后应置室温（25-28℃）平衡20分钟；每次检测后剩余试剂请及时于2～8℃保存。

2.将浓缩洗涤液用双蒸水或去离子水稀释(1份加19份水)。

3. 如有5×标准品稀释液用双蒸水或去离子水稀释(1份加4份水)。

4.标准品:按标签复溶体积用标准品稀释液复溶使BAFF终浓度达到4000pg/ml，室温反应，请严格控制在25～28℃，静置15~20分钟后轻轻混匀（建议抽吸几次）待彻底溶解，用标准品稀释液倍比梯度稀释后依次加入检测孔中。（标准曲线取七个点，最高浓度为4000 pg/ml,标准品稀释液直接加入作为0浓度.）



标准品倍比稀释示意图。按标准品(STANDARD)标签上标注体积加入标准品稀释液溶解并混匀后的浓度为标准品的起始浓度。其它的倍比稀释后的浓度依次为起始浓度的1/2、1/4、1/8、1/16和1/32。

洗涤方法:

自动洗板机或人工洗板：每孔洗涤液为300ul，注入与吸出间隔15-30秒。最后一次洗板完成后将板倒扣着在厚吸水纸上用力拍干。

6、操作步骤:

1.通过计算并确定一次性实验所需的板条数，取出所需板条放置在框架内，暂时用不到板条请放回铝箔袋密封，保存于4℃。

2.建议设置本底较正孔，即空白孔,设置方法为该孔只加TMB显色液和中止液。每次实验均需做标准品对照并画出标准曲线。

3.分别将样品或不同浓度标准品按照100μl/孔加入相应孔中，用封板膜封住反应孔，室温（25-28℃）孵育120分钟。对于血清血浆样本，先加50ul的样本分析缓冲液，再加样本。如检测超出范围，请先加50ul的样本分析缓冲液，再加稀释后的样本50μl检测。请注意记录好样品的稀释倍数（用标准品稀释液稀释），此处加样量50ul相当于已稀释了2倍。

4.洗板5次，且最后一次置厚吸水纸上拍干。

5.加入生物素化抗体工作液(100ul/孔)。用封板胶纸封住反应孔，室温（25-28℃）孵育60分钟。

6.洗板5次，且最后一次置厚吸水纸上拍干。

7.加入亲和素连接的HRP酶工作液(100ul/孔)。用封板胶纸封住反应孔，避光室温（25-28℃）孵育20分钟。

8.洗板5次，且最后一次置厚吸水纸上拍干。

9.加入显色剂TMB100ul/孔，避光室温（25-28℃）孵育20分钟。

10.加入中止液50ul/孔,混匀后即刻测量OD450值。

7、结果判断:

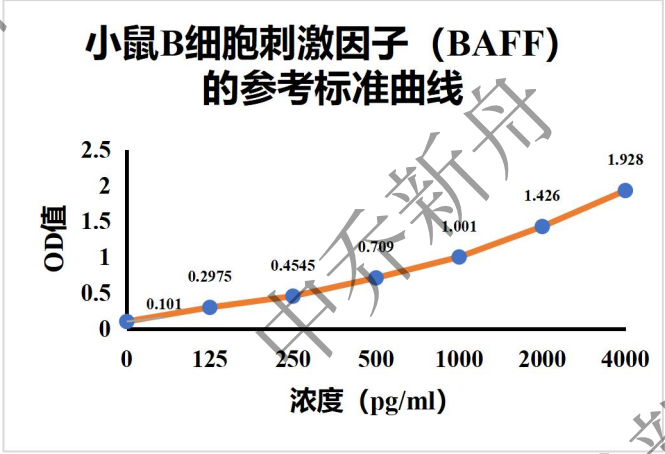
1.复孔值在20%差异范围内结果有效，复孔值平均后可作为测量值。

2.每个标准品或标本的OD值应减去本底校正孔的OD值。

3.手工绘制标准曲线。以标准品浓度作横坐标，OD值作纵坐标，以平滑线连接各标准品的坐标点。通过标本的OD值可在标准曲线上查出其浓度。

4.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。

小鼠BAFF参考标准曲线



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标本含量。

8、灵敏度，特异性和重复性:

1.灵敏度：多次重复结果表明，最小检出量为58pg/ml。

2.特异性：与小鼠APRIL,BAFF R/Fc Chimera及人BAFF没有交叉反应。

3.重复性：板内，板间变异系数均<10%.

9、注意事项:

1.试剂盒请保存在2～8℃。

2.浓缩洗涤液因在低温下可能有结晶，请水浴加热使结晶完全溶解后再配制工作液。

3.标准品复溶加样后，剩余部份请丢弃。

4.底物请勿接触氧化剂和金属。

5.加样时，请及时更换枪头，避免交叉污染。

6.严禁混用不同批号的试剂盒组份。

7.充分混匀对保证反应结果的准确性很重要，在加液后请轻轻叩击边缘以保证混匀。

8.室温反应，请严格控制在25～28℃。

9.洗涤过程是至关重要的，洗涤不充分会使精确度下降并导致结果误差较大。

10.试验中标准品和样本检测时建议作双复孔。

11.加样过程中避免气泡的产生。

12.血清和血浆标本的检测时，检测抗体的孵育时间应适当延长。