

ELISA试剂盒使用说明书

Human Fas Ligand/TNFSF6 ELISA Kit



全国统一热线：400-600-4213
www.biosharp.cn

本试剂盒用于定量检测人血清、血浆或细胞培养上清液等样本中天然和重组Fas Ligand/TNFSF6浓度。使用前请仔细阅读说明书并检查试剂组分，如有任何疑问请与合肥兰杰柯科技有限公司联系，公司将为您提供强有力的技术支持。

目录

| | |
|----------------|---|
| 一、产品简介 | 2 |
| 二、检测原理 | 2 |
| 三、试剂盒组分 | 3 |
| 四、储存条件 | 3 |
| 五、注意事项 | 3 |
| 六、其它实验材料 | 4 |
| 七、使用说明 | 4 |
| 1、样品收集、处理及保存方法 | 4 |
| 2、试剂准备 | 4 |
| 3、操作步骤 | 5 |
| 4、操作流程图 | 6 |
| 5、操作要点提示 | 6 |
| 6、结果判断 | 6 |
| 八、常见问题分析及解决 | 8 |

Human Fas Ligand/TNFSF6 (Fas配体) ELISA KIT

| 货号 | 名称 | 规格 |
|--------------|---|-----|
| BSEH-196-48T | Human Fas Ligand/TNFSF6 (Fas配体) ELISA KIT | 48T |
| BSEH-196-96T | Human Fas Ligand/TNFSF6 (Fas配体) ELISA KIT | 96T |

一、产品简介

Fas配体 (FasL), 也称为TNFSF6, CD178或CD95L, 是肿瘤坏死因子 (TNF) 超家族的成员。其主要作用是在表达其受体Fas (也称为Apo-1, CD95, TNFRSF6) 的细胞中诱导凋亡。原型Fas / FasL凋亡级联作用包括Fas激活及其与衔接蛋白, Fas相关死亡结构域 (FADD) 和caspase-8的缔合形成死亡诱导信号传导复合物 (DISC)。这导致几种效应物胱天蛋白酶在下流的激活和凋亡的启动。

最初是使用外周血淋巴细胞的mRNA来进行反向聚合酶链反应分离人FasL。FasL在氨基酸水平上与其小鼠的对应物有76.9%同源性, 并且主要在激活的T淋巴细胞和免疫特权组织包括眼, 睾丸和胎盘中组成型表达。FasL也可能在暴露于UV光下或细胞毒性药物后被上调。

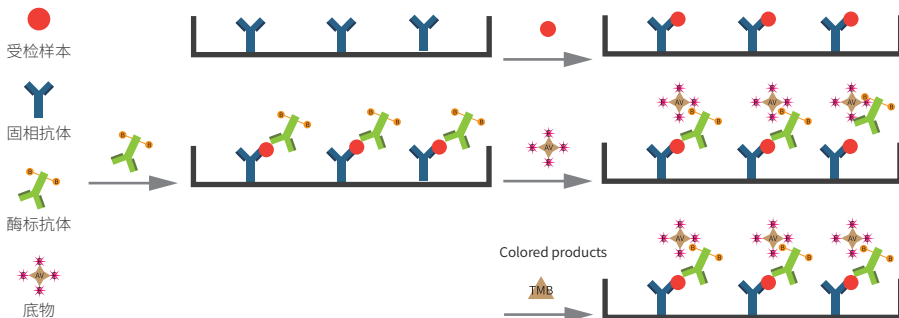
FasL会通过蛋白水解切割来释放分子的26kDa可溶形式 (sFasL), 并且生化评估中表明sFasL是作为三聚体存在。sFasL的释放被基质金属蛋白酶 (MMP) 的抑制剂阻断。更具体地, MMP-7 (基质溶解素) 和在MMP-3 (基质溶素-1, 较小程度) 已经被鉴定为释放sFasL的蛋白酶。MMP-7切割位点在跨膜结构域附近并且包括人FasL的ELAELR序列, 其次是与ELAELR相邻的SL序列。已经描述了其他切割点, 表明其它蛋白酶可能参与人sFasL的产生。

sFasL在细胞凋亡调节中的生理作用仍不清楚。虽然人类sFasL可以刺激细胞凋亡, 这种活性一般被认为是远远低于与膜相关的FasL。此外, 已经显示非凋亡sFasL可以与FasL竞争受体结合, 并且可以作为Fas信号传导的天然抑制剂。相反, sFasL诱导的凋亡可以通过sFasL三聚体的交联显著上调。

某些细胞类型不响应于Fas刺激而进行细胞凋亡。例如, Fas激活可致人T细胞和成纤维细胞的增殖, sFasL可作为嗜中性粒细胞的化学引诱物。在人成纤维细胞中, sFasL刺激细胞外信号调节激酶 (ERKS) 1和2的磷酸化, NF- κ B的激活和白细胞介素-6基因表达。此外, Fas通过ERK激活和p35上调诱导神经突生长。

二、检测原理

本实验采用双抗体夹心ELISA。用抗人Fas Ligand/TNFSF6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Fas Ligand/TNFSF6会与其单抗结合, 洗去游离成分; 加入生物素化的抗人Fas Ligand/TNFSF6抗体, 抗人Fas Ligand/TNFSF6抗体与结合在单抗上的人Fas Ligand/TNFSF6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Fas Ligand/TNFSF6, 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, Fas Ligand/TNFSF6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Fas Ligand/TNFSF6浓度。



三、试剂盒组成

| 组分编号 | 组分 | 96t | 48t | 储存条件 |
|-------------|------------|------|-----|-------|
| BSEH-196-1 | 标准品 | 2支 | 1支 | -20°C |
| BSEH-196-2 | 标准品和标本稀释液 | 1瓶 | 1瓶 | 2-8°C |
| BSEH-196-3 | 浓缩生物素化抗体 | 2支 | 1支 | 2-8°C |
| BSEH-196-4 | 生物素化抗体稀释液 | 1瓶 | 1瓶 | 2-8°C |
| BSEH-196-5 | 浓缩酶结合物(避光) | 2支 | 1支 | 2-8°C |
| BSEH-196-6 | 酶结合物稀释液 | 1瓶 | 1瓶 | 2-8°C |
| BSEH-196-7 | 浓缩洗涤液 20× | 1瓶 | 1瓶 | 2-8°C |
| BSEH-196-8 | 显色剂(避光) | 1瓶 | 1瓶 | 2-8°C |
| BSEH-196-9 | 终止液 | 1瓶 | 1瓶 | 2-8°C |
| BSEH-196-10 | 抗体包被板条 | 8×12 | 8×6 | 2-8°C |
| BSEH-196-11 | 封板胶纸 | 4张 | 2张 | 2-8°C |
| | 说明书 | 1份 | 1份 | |

四、储存条件

未启封试剂盒2-8°C保存有效期6个月,启封后建议一个月内使用完毕。产品收到后标准品-20°C保存,其它组分2-8°C保存。

五、注意事项

- 1、试剂盒保存在2-8°C,除复溶后的标准品,其它成分不可冷冻。
- 2、浓缩生物素化抗体、浓缩酶结合物装量极少,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。
- 3、不同批号试剂不可混用。
- 4、为避免交叉污染请使用一次性吸头。
- 5、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。
- 6、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。
- 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。

六、其它实验材料

- 1、酶标仪(450 nm)
- 2、高精度可调移液器及吸头:0.5-10, 2-20, 20-200, 200-1000 μL ;一次检测样品较多时,最好用多通道移液器
- 3、自动洗板机或洗瓶
- 4、37°C温箱
- 5、双蒸水或去离子水
- 6、坐标纸
- 7、量筒

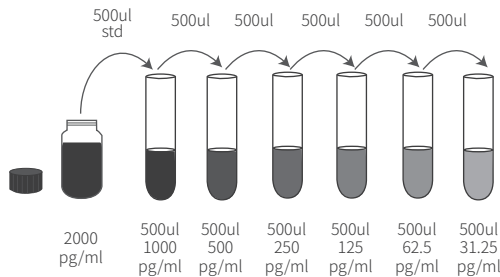
七、使用说明

7.1 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 \times g离心10min,小心分离血清。
 - 2.血浆:用EDTA、肝素作为抗凝剂收集血浆,收集后30min内以1000 \times g离心15min去除颗粒。
 - 3.细胞上清液:1000 \times 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°C~-70°C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°C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:正常人血清或血浆样本建议做1:2稀释。

7.2 试剂准备

- 1.提前30 min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°C。
- 3.标准品:加入标准品/标本稀释液1.0mL至冻干标准品中,待彻底溶解后,静置15分钟混匀(浓度为2000pg/mL),然后根据需要进行稀释,见下图(建议标准曲线使用以下浓度:2000、1000、500、250、125、62.5、31.25、0pg/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°C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100 μ L来计算总的用量, 多配制100-200 μ L。以生物素化抗体稀释液稀释浓缩生物素化抗体(1:100)。最好现用现配。

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 | 110 μ L | + | 10890 μ L |
| 10 | 90 μ L | + | 8910 μ L |
| 8 | 70 μ L | + | 6930 μ L |
| 6 | 50 μ L | + | 4950 μ L |
| 4 | 33 μ L | + | 3267 μ L |
| 2 | 17 μ L | + | 1683 μ L |
| 1 | 9 μ L | + | 891 μ L |

5. 酶结合物工作液: 以酶结合物稀释液稀释浓缩酶结合物(1:100)。最好现用现配。

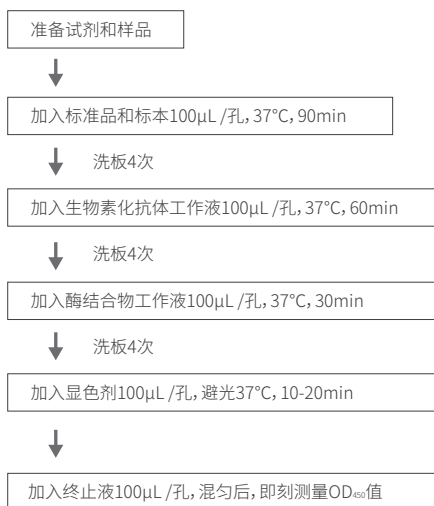
浓缩酶结合物稀释方法

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

7.3 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(100 μ L/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 $^{\circ}$ C孵箱孵育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350 μ L, 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350 μ L, 静置30秒后甩尽液体, 在厚迭吸水纸上拍干。
4. 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)。
5. 洗板4次。
6. 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)。
7. 洗板4次。
8. 加入显色剂100 μ L/孔, 避光, 37 $^{\circ}$ C孵箱孵育10-20分钟。
9. 加入终止液100 μ L/孔, 混匀后即刻测量OD450值(5分钟内)。

7.4 操作流程图



7.5 操作要点提示

- 1、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。
- 2、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。
- 3、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。
- 4、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。
- 5、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。

7.6 结果判断

- 1、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。
- 2、使用计算机软件以吸光度OD值为纵坐标(Y), 相应的Fas Ligand/TNFSF6标准品浓度为横坐标(X), 生成相应的标准曲线, 样品的Fas Ligand/TNFSF6含量可根据其OD值由标准曲线换算出相应的浓度。
- 3、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 | 0.048 | 0.049 | 0.049 | — |
| 31.25 | 0.123 | 0.117 | 0.120 | 0.071 |
| 62.5 | 0.198 | 0.203 | 0.201 | 0.152 |
| 125 | 0.397 | 0.394 | 0.396 | 0.347 |
| 250 | 0.722 | 0.713 | 0.718 | 0.669 |
| 500 | 1.295 | 1.287 | 1.291 | 1.242 |
| 1000 | 1.985 | 1.904 | 1.945 | 1.896 |
| 2000 | 2.766 | 2.754 | 2.760 | 2.711 |

八、常见问题分析及解决

| 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 试剂配制/使用有误 | 使用新配制的试剂, 禁含叠氮钠 重做试验, 严格按照说明书操作, 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 | 洗板不充分, 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 | 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 | | 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 | | 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 | |
| | 酶过量过多 | 加酶前检查移液器调节量是否准确 检查稀释度, 必要时进行效价测定 | |
| 全部板子变成规则的蓝色 | 不充分的洗涤/洗涤步骤被遗漏使没结合的HRP仍有残留 | 最好使用洗板机充分洗涤 检查每孔是否有残留的洗液或加样量是否准确 | |
| | 太多的酶结合物 | 检查稀释度, 必要时进行效价测定 | |
| 高CV值花板 | 封板膜或试剂容器被重复使用, 导致HRP残留, 使TMB底物产生非特异蓝色 | 使用新封板膜, 每步使用不同的试剂容器 | |
| | 操作不慎或洗涤不充分 | 按说明书洗板、加样和显色, 洗板尤为重要 | |
| | 出现干板, 没有使用封板膜、封板膜重复使用 | 确定每两步骤间酶标板应保持湿润 使用封板膜封口, 注意每步使用新鲜的封板膜 | |
| 标准曲线可得到, 但两点之间区别很差(低或平的曲线) | 移液器不准确, 吸头重复使用 | 检查并校准移液器, 每次取样必须更换吸头 | |
| | 酶结合物不足 | 检查稀释度, 必要时进行效价测定 | |
| | 检测抗体不足 | 检查稀释度, 必要时进行效价测定 | |
| | 板子显色不足 | 延长底物孵育时间 使用推荐品牌的底物溶液 | |
| 标准曲线很好, 但没有任何期望的阳性信号 | 标本中无相应的待检测物质 | 使用内参对照 重复实验, 重新考虑实验的相应参数 | |
| | 标本基质遮盖检测 | 将标本至少做1:2相应的稀释, 或进行系列稀释 | |
| 标准曲线很好, 但标本的判读值很高 | 标本中含的待检物质水平超过实验范围 | 稀释标本 | |
| 边缘效应 | 工作环境温度不均衡 | 避免将板子在变化温度环境中孵育 | |
| 漂移 | 实验过程中出现间断 | 整个实验应连续操作, 在实验开始前将所有的标准品和标本做适当的准备。 | |
| | 试剂没有按说明书平衡至室温 | 在所有试剂加入孔前, 确保它们已平衡至室温, 除非说明书中有另外的要求。 | |
| | 是否可更改试剂盒所提供的操作步骤? | 一般厂商为确保最高的灵敏度, 对试剂盒都进行了优化, 为确保每一试剂盒实验的规范性应按说明书操作。 | |
| | 是否可混用不同批次试剂盒中的试剂? | 不可以, 绝大多数试剂在每批试剂盒中是特异的, 若有问题可与厂家或代理商联系。 | |
| | 是否可增加或减少标本的体积? | 商品化的试剂盒所需加入的标本体积是优化的, 应按说明书操作, 不建议更改所加标本体积。 | |
| | 是否可重新确定自己的标准曲线的点? | 可以。说明书上有建议制备标准曲线时标准品的稀释度, 可改变稀释倍数和增加曲线的点, 但是必须在实验范围内, 高于试剂盒中最高标准品的点和低于灵敏度以下的点是无效的。 | |

