

小鼠RAGE双抗夹心ELISA检测试剂盒

请在实验前仔细阅读本说明书

产品货号: KE10086

规格: 96T

灵敏度: 6.7 pg/mL

检测范围: 62.5 - 4000 pg/mL

用途: 此试剂盒用于定量检测血清、血浆、细胞上清以及组织裂解液中的小鼠RAGE浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

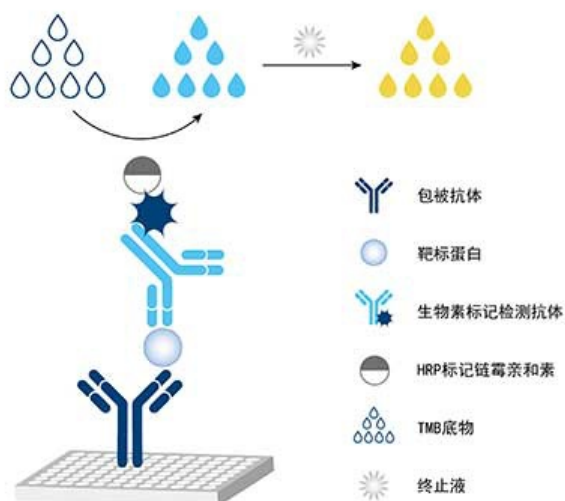
目录

一：背景信息	3
二：检测原理	3
三：需自备的实验器材	3
四：试剂盒组分及储存	4
五：实验注意事项	4
六：样本准备	5
七：试剂准备	5
八：实验步骤	6
九：实验参数	7
9.1 参考标曲图	7
9.2 精密度	7
9.3 加标回收率	8
9.4 样本值	8
9.5 灵敏度	8
9.6 线性	9
十：参考文献	9

一：背景信息

RAGE晚期糖基化终产物受体也称为 AGER，是免疫球蛋白超家族的细胞表面受体。它介导晚期糖基化终产物AGE 的相互作用，在糖尿病和老化血管组织中大量积累；同时可作为血管炎症的介质，如动脉粥样硬化和糖尿病并发症。AGE/RAGE 信号调节2型糖尿病中TNF- α 、氧化应激和内皮功能障碍的产生或表达。在内皮细胞、单核吞噬细胞和淋巴细胞，RAGE 与S100A12相互作用会触发细胞活化。心肌梗死后，RAGE 与 S100B 相互作用时通过激活 ERK1/2和 P53/TP53信号来调节心肌细胞凋亡。RAGE 作为 β 淀粉蛋白(ABPP)的受体，调节 ABPP 从胞外到胞内的转位。ABPP 介导的 RAGE 信号传导，特别是通过P38丝裂原活化蛋白激酶刺激作用，将 ABPP 作为 RAGE 的复合物传递到神经元内。RAGE 在肺组织特别是肺泡 I 型细胞中有较高的表达，并在特发性肺纤维化中丢失。

二：检测原理



◀双抗夹心模式图 (检测抗体标记生物素)

按操作顺序形成抗体夹心结构后，加入TMB底物，板孔液体由无色变成蓝色，再加入终止液液体变为黄色后进行吸光度值测定。

三：需自备的实验器材

- 3.1 酶标仪 (可读取450 nm和630 nm双波长)；
- 3.2 高精度移液器及一次性移液器枪头；
- 3.3 超纯水或去离子水；
- 3.4 洗板机 (亦可手动洗板)；
- 3.5 EP管 (用于稀释标准品及样本)；
- 3.6 吸水毛巾或滤纸 (用于拍干)；
- 3.7 烧杯和量筒；
- 3.8 100 mM PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride) 存储液 (1 g PMSF溶于57 mL异丙醇)，样本需要裂解才用；
- 3.9 用于ELISA实验的数据分析的统计拟合软件 (推荐四参数拟合方法)，如：Origin，ELISA Calc等。

四：试剂盒组分及储存

英文名称	中文名称	规格	数量
Microplate	预包被酶标板 - 96 孔板	8孔 X 12条	1 块
Protein standard	标准品 - 冻干粉状 *	6000 pg/瓶	2 瓶
Detection Antibody (100×), biotinylated	生物素标记检测抗体浓缩液 (100×) **	120 µL/支*	1 支
Streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) (100×)	HRP标记链霉亲和素浓缩液 (100×) **	120 µL/支*	1 支
Sample Diluent PT 4	样本稀释液 PT 4	30 mL/瓶	2 瓶
Detection Diluent	抗体稀释液	30 mL/瓶	1 瓶
Wash Buffer Concentrate (20×)	浓缩洗涤液 (20×)	30 mL/瓶	1 瓶
Extraction Reagent	裂解液	30 mL/瓶	1 瓶
Tetramethylbenzidine Substrate (TMB)	显色底物 TMB	12 mL/瓶	1 瓶
Stop Solution	终止液	12 mL/瓶	1 瓶
Plate Cover Seals	封板膜		4 张
储存条件： 1：未开启试剂盒可在2-8℃条件下存放6个月或者在-20℃条件下存放1年 2：已开启试剂盒可在2-8℃存放7天 3：每次实验均使用新的标准品,使用后丢弃			

* 使用对应的样本稀释液对标准品进行复溶，复溶过程避免产生气泡

** 开盖前请离心

五：实验注意事项

- 5.1 避免皮肤接触终止液以及TMB 显色液；
- 5.2 在实验过程中，注意穿戴个人防护装备，如实验服，手套，口罩和护目镜；
- 5.3 请勿将不同批次的试剂进行混用，过期产品请勿使用；
- 5.4 在使用自动洗板机时，板孔加入洗涤液之后，设置30秒的浸泡程序，以提高分析的精确度。

六：样本准备

6.1 血清：全血标本室温凝固 30 min后1000×g 离心15 min，取上清立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融。

6.2 血浆：可用EDTA、肝素或柠檬酸盐作为抗凝剂，标本采集后1000×g 离心15 min，立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融
(注意：标本溶血会影响检测结果，因此溶血标本不宜进行检测)。

6.3 细胞上清：收集细胞培养液，500×g 离心5 min取上清，立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融。

6.4 组织裂解液：

1) 使用预冷的1×PBS清洗组织，吸干水分后，用剪刀剪碎，加入适量的裂解液(加PMSF至裂解液中，终浓度为1 mM，每100 mg组织加入1 mL裂解液，不同样本需自行优化)；

2) 转移到预冷玻璃匀浆器中，匀浆约20-30下。匀浆效果与细胞类型和组织类型相关，不同细胞或组织所需的匀浆次数有所不同，需自行优化；

3) 匀浆20-30次后取约2-3 μL细胞或组织匀浆液滴在盖玻片上并在显微镜下观察，如见细胞核周晕环或完整的细胞形态，说明细胞仍完整。如果有70-80%的细胞均无核周晕环和完整细胞形态，说明细胞已经充分破碎，则进行下一步实验。否则，重新匀浆10-30次直到细胞至少90%已经破碎；

4) 细胞破碎后8000×g-10000×g离心5 min，分离上清，分装后-80℃存放，并用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定总蛋白浓度，避免反复冻融。

七：试剂准备

7.1 洗涤液 (1×)：

如果洗涤液 (20×) 有晶体析出，37℃加热至晶体全部溶解。按1:20稀释倍数进行稀释：如取30 mL 浓缩洗涤液 (20×)，加入570 mL 超纯水或去离子水，得到洗涤液 (1×)。

7.2 检测抗体 (1×)：

开盖前瞬时离心，按1:100比例进行稀释，稀释前根据预先计算实验所需的总量配制 (100 μL/孔)，实际配制时应多配制0.1-0.2 mL。如10 μL 检测抗体浓缩液 (100×) 加 990 μL **抗体稀释液**进行配制，轻轻混匀。

7.3 HRP标记链霉亲和素 (1×)：

开盖前瞬时离心，按1:100比例进行稀释，稀释前根据预先计算实验所需的总量配制 (100 μL/孔)，实际配制时应多配制0.1-0.2 mL。如10 μL HRP标记的链霉亲和素浓缩液 (100×) 加 990 μL **抗体稀释液**进行配制，轻轻混匀。

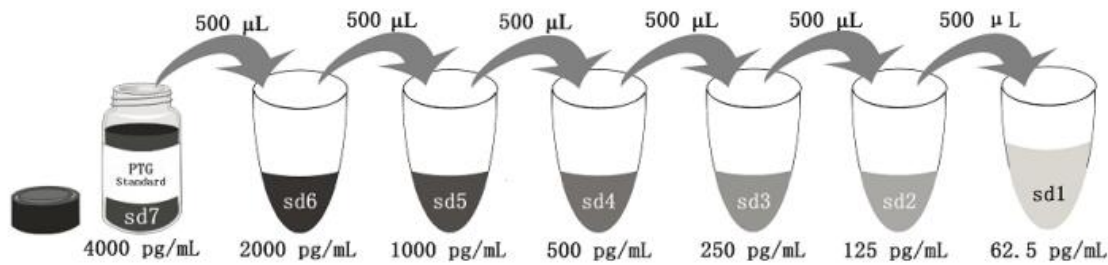
7.4 待检测样本：

不同的样本使用相应的样本稀释液进行稀释，如果样本检测值超过标曲最高范围，可将样本进行一定的稀释后再进行实验，使样本的检测值处于标曲范围内，不同样本的稀释倍数需自行优化。

稀释比推荐如下：小鼠血清和血浆样本1:10稀释；细胞上清样本1:80或1:160稀释；组织裂解液样本1:400或1:800稀释；样品采集、处理和储存的差异可能导致测值的改变。

7.5 梯度稀释的标准品：

使用1.5 mL PT 4 样本稀释液复溶标准品，具体操作如下：



Add # µL of Standard diluted in the previous step	—	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
# µL of Sample Diluent PT 4	1500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
	"sd7"	"sd6"	"sd5"	"sd4"	"sd3"	"sd2"	"sd1"

八：实验步骤

实验前，需要将所需试剂在室温平衡20-30 min (检测抗体浓缩液、HRP标记链霉亲和素浓缩液不需要平衡室温，即用即取)；在进行标准品、样本以及不同试剂加样时，更换枪头，避免接触微孔板的内表面，不同的试剂，使用不同的加样槽。

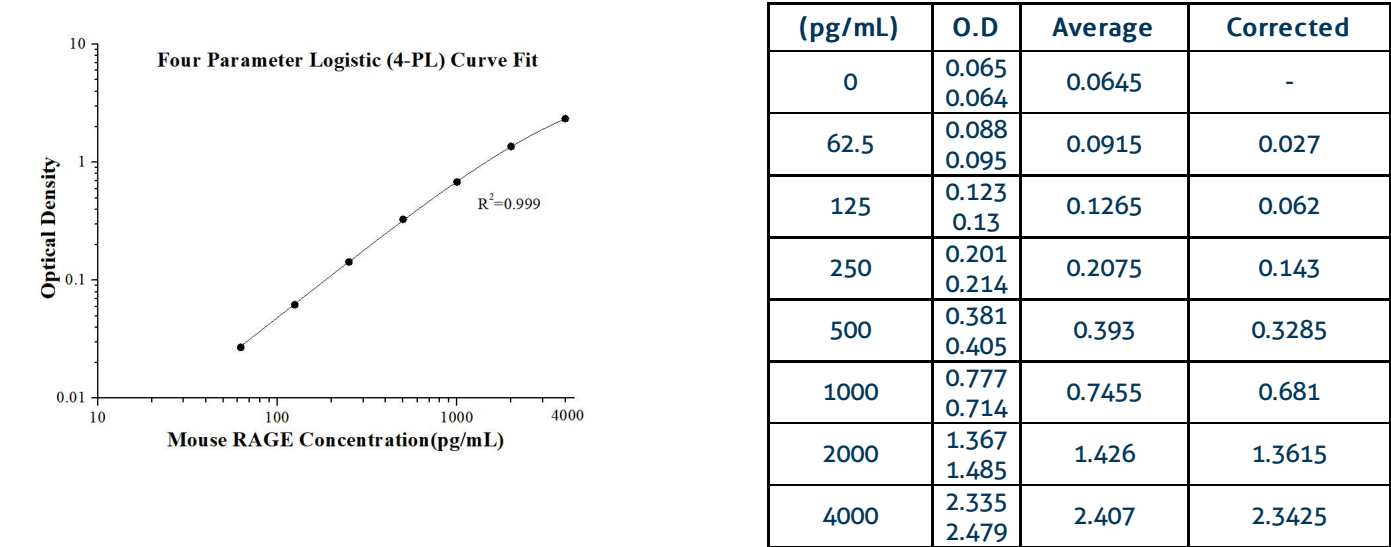
- 8.1 根据实验用量，取出需要用到的酶标板条，剩余板条加入干燥剂放入铝箔袋密封后存放于4℃，并于一周之内用完；
- 8.2 加样，分别设零孔、标准孔、待测样本孔。零孔加样本稀释液100 µL，余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本100 µL/孔，注意不要产生气泡（建议标准品和样本都做复孔，尽量避免实验误差，确保上样不间断，5-10 min完成加样）；
- 8.3 酶标板盖上覆膜，37℃孵育2 h；
- 8.4 洗涤
 - 1) 揭开封板膜（动作轻柔，避免动作过大导致液体溢出串孔），弃液体，拍干；
 - 2) 洗涤液（1×）洗涤板条，每孔350-400 µL，洗涤后，甩掉液体拍干板条，重复此步骤4次，避免异物进入板孔以及板条干燥；
- 8.5 每孔加100 µL 检测抗体（1×）（参照试剂准备部分7.2），盖上封板膜，37℃孵育1 h；
- 8.6 重复步骤8.4；
- 8.7 每孔加 100 µL HRP标记链霉亲和素（1×）（参照试剂准备部分7.3），盖上封板膜，37℃孵育40 min；
- 8.8 重复步骤8.4；
- 8.9 显色：每孔加TMB显色液100 µL，37℃避光显色 15-20 min（如果颜色偏浅，可适当延长显色时间，不超过30 min；保持显色底物始终处于避光状态，显色底物在加样前应是无色透明，如有变色，请勿使用）；
- 8.10 终止：每孔加终止液100 µL，蓝色变黄色。终止液与TMB显色液的加样顺序一致；（注意：眼睛和皮肤避免接触终止液）
- 8.11 读数：以630 nm为校正波长，用酶标仪在450 nm波长测量各孔的光密度(OD值)。加入终止液后5 min内进行读数，若无630 nm 波长，也可直接使用450 nm 波长读数；
- 8.12 数据分析：每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

操作流程如下：

步骤	试剂	体积	孵育时间	洗涤次数	孵育温度
1	标准品或样本	100 μL	120 分钟	4 次	覆膜后37℃孵育
2	检测抗体（1×）	100 μL	60 分钟	4 次	覆膜后37℃孵育
3	HRP标记链霉素亲和素（1×）	100 μL	40 分钟	4 次	覆膜后37℃孵育
4	显色 TMB	100 μL	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37℃孵育，避光
5	终止液	100 μL	0 分钟	不需要洗涤	-
6	加入终止液后以630 nm为校正波长，在450 nm处测量OD值，此过程建议不超过5分钟				

九：实验参数

9.1 参考标曲图



9.2 精密度

板内精密度：3个不同浓度的样本在板内重复测定 20次；

板间精密度：3个不同浓度的样本在板间重复测定 24次。

板内精密度 (CV内)					板间精密度 (CV 间)				
样本	数量	平均值 (pg/mL)	标准差	变异系数CV%	样本	数量	平均值 (pg/mL)	标准差	变异系数CV%
1	20	1,632.8	37.0	2.3	1	24	1,630.4	52.3	3.2
2	20	453.1	9.7	2.1	2	24	458.8	11.1	2.4
3	20	184.1	12.2	6.6	3	24	193.2	13.5	7.0

9.3 加标回收率

样本稀释后，在标曲范围内选择高、中、低3个浓度，进行小鼠RAGE的加标回收率实验，结果如下：

样本类型	稀释倍数	平均值 (%)	范围 (%)
小鼠血清	1:10	91	71-110
	1:20	86	72-98
细胞上清	1:300	97	74-130
	1:600	96	72-117
组织裂解液	1:1500	91	75-114
	1:3000	97	76-121

9.4 样本值

小鼠血清 - 应用本试剂盒，检测小鼠血清样本中小鼠RAGE的浓度

样本类型	均值 (pg/mL)	范围 (pg/mL)
小鼠血清 (n=15)	3133.8	185.3-11708.8

细胞上清 - 将小鼠肺用足够的PBS冲洗，并置于冰上。用组织匀浆器将组织匀浆，在添加10%胎牛血清、2 mM L-谷氨酰胺、100 U/mL青霉素和100 mg/mL硫酸链霉素的RPMI 1640培养基中培养3天。收集细胞上清，检测小鼠RAGE的浓度为110.6 ng/mL。

组织裂解液 - 将小鼠肺组织裂解后，检测小鼠RAGE的浓度为851.3 ng/mL。

9.5 灵敏度

用20个重复的零孔平均OD值加上两倍标准差得到的OD值带入标准曲线拟合出对应的浓度值，此试剂盒中小鼠RAGE的灵敏度为6.7 pg/mL。

9.6 线性

用对应样本稀释液稀释样本，使稀释后的检测值处于标曲范围内，线性数据如下：

(小鼠血清样本预先稀释5倍，细胞上清样本预先稀释40倍，组织裂解液样本预先稀释200倍)

稀释倍数		小鼠血清	细胞上清	组织裂解液
1:2	均值 (%)	100	100	100
	范围 (%)	-	-	-
1:4	均值 (%)	107	104	111
	范围 (%)	102-109	86-124	78-126
1:8	均值 (%)	116	107	107
	范围 (%)	106-127	98-112	77-126
1:16	均值 (%)	120	100	109
	范围 (%)	114-127	75-120	86-132

十：参考文献

1. Neeper M. et al. (1992) J Biol Chem. 267(21):14998-5004.
2. Hofmann MA. et al. (1999) Cell. 97(7):889-901.
3. Markus A. et al. (2008) Am J Respir Cell Mol Bio. 39(3):337-45.
4. Xue G. et al. (2008) Am J Physiol Heart Circ Physiol. 295(2):H491-8.
5. Takuma K. et al. (2009) Proc Natl Acad Sci U S A. 106(47):20021-6.
6. Fang F. et al. (2010) FASEB J. 24(4):1043-55.