

小鼠Tie-2双抗夹心ELISA检测试剂

请在实验前仔细阅读本说明书

产品货号: KE10194

规格: 96T

灵敏度: 7.6 pg/mL

检测范围: 46.88-3000 pg/mL

用途: 此试剂盒用于定量检测血清、血浆、细胞上清、细胞裂解液、组织裂解液以及组织匀浆中的小鼠Tie-2浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

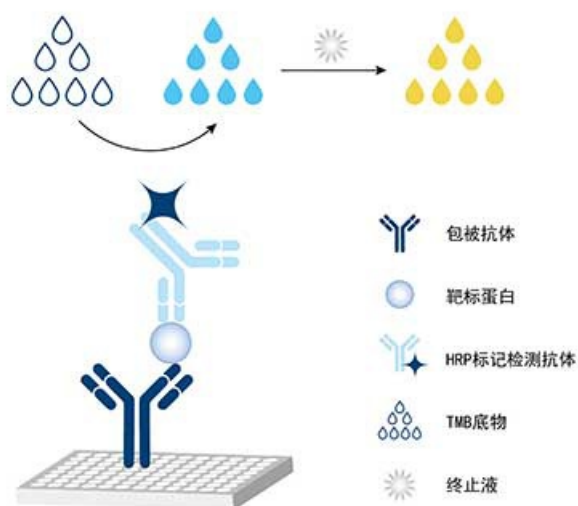
目录

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	9
9.6 线性	9
9.7 特异性	9
十：参考文献	9

一：背景信息

Tie-2 (也称为 TEK 或 CD202b)是一种受体酪氨酸激酶 (RTK)，对血管发育、血管生成及内皮细胞功能具有关键作用。Tie-2 对血管成熟至关重要。小鼠模型中敲除Tie-2或Ang-1基因会因心脏发育缺陷和血管重塑异常导致胚胎致死。配体诱导的Tie-2磷酸化可激活PI3K-AKT通路 (促进细胞存活) 和MAPK通路 (调控增殖与迁移)。

二：检测原理



◀双抗夹心模式图 (检测抗体直标HRP)

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 洗板机 (亦可手动洗板);
- 3.4 EP管 (用于稀释标准品及样本);
- 3.5 吸水毛巾或滤纸 (用于拍干);
- 3.6 烧杯和量筒;
- 3.7 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 × 12条	1 块
Protein standard	标准品 - 冻干粉状 *	6000 pg/瓶	2 瓶
Detection antibody, HRP-conjugated (100×)	HRP标记检测抗体浓缩液 (100×) **	120 µL/支	1 支
Sample Diluent PT 4B1	样本稀释液 PT 4B1	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 细胞裂解液：收集细胞后，用预冷(2-8℃)的1×PBS洗3次，500×g离心5 min。细胞计数，离心弃上清；加PMSF至细胞裂解液中，终浓度为1 mM；按每 1×10^7 个细胞，加入1 mL细胞裂解液(含PMSF)，冰上裂解30 min，其间上下颠倒使裂解更充分，超声波破碎处理，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。

6.5 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。

6.6 组织匀浆：使用预冷的1×PBS清洗组织去除多余的血液，用剪刀剪碎至1-2 mm，加入5-10 mL PBS至组织中进行匀浆处理，-80℃条件下冻存5 min，经过两个冻融周期后破坏细胞膜，5000×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 HRP标记检测抗体 (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 HRP标记检测抗体浓缩液 (100×) 加 990 μL 抗体稀释液进行配制，轻轻混匀。

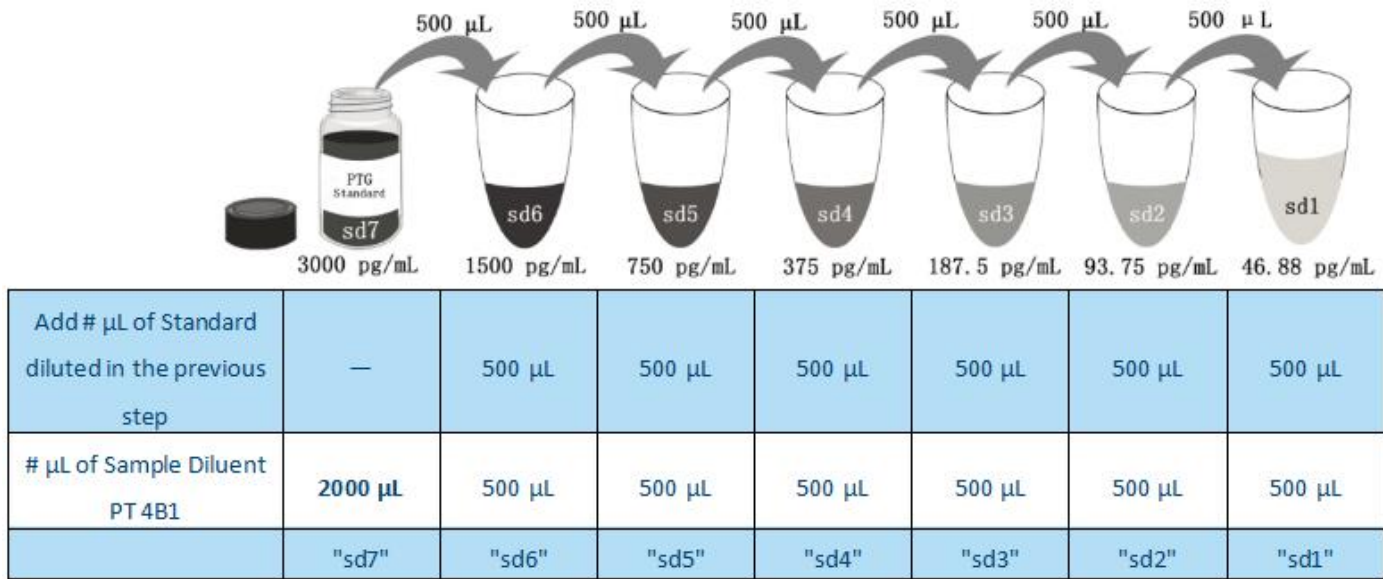
7.3 待检测样本：

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1:15或1:30稀释；细胞上清和组织匀浆样本1:2或1:4稀释；细胞裂解液和组织裂解液样本1:16至1:256稀释；样品采集、处理和储存的差异可能导致测值的改变。

7.4 梯度稀释的标准品：

使用2 mL PT 4B1 样本稀释液复溶标准品，具体操作如下：



八：实验步骤

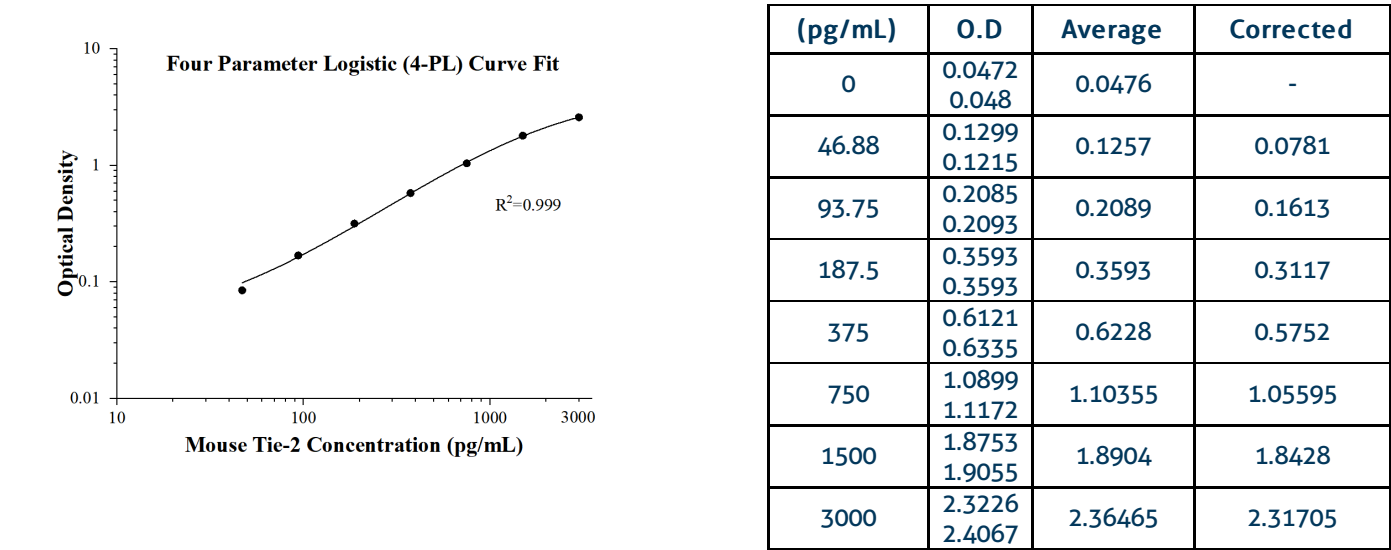
- 实验前，需要将所需试剂在室温平衡20-30min（HRP标记检测抗体浓缩液不需要平衡室温，即用即取）；在进行标准品、样本以及不同试剂加样时，更换枪头，避免接触微孔板的内表面，不同的试剂，使用不同的加样槽。
- 8.1 根据实验用量，取出需要用到的酶标板条，剩余板条加入干燥剂放入铝箔袋密封后存放于4℃，并于一周之内用完；
 - 8.2 加样，分别设零孔、标准孔、待测样本孔。零孔加样本稀释液100 µL，余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本100 µL/孔，注意不要产生气泡（建议标准品和样本都做复孔，尽量避免实验误差，确保上样不间断，5-10 min完成加样）；
 - 8.3 酶标板盖上覆膜，37℃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 HRP标记检测抗体（1×）（参照试剂准备部分7.2），盖上封板膜，37℃孵育40 min；
 - 8.6 重复步骤8.4；
 - 8.7 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）；
 - 8.8 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）
 - 8.9 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；
 - 8.10 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	HRP标记检测抗体（1×）	100 μL	40 分钟	4 次	覆膜后37℃孵育
3	显色 TMB	100 μL	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37℃孵育，避光
4	终止液	100 μL	0 分钟	不需要洗涤	-
5	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 8 次；
板间精密度: 3个不同浓度的样本在板间重复测定 16 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	8	1,574.2	52.4	3.3	1	16	1,500.7	103.6	6.9
2	8	376.5	20.1	5.3	2	16	408.6	37.2	9.1
3	8	194.1	8.1	4.2	3	16	218.0	28.7	13.2

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Tie-2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	1:32	99	93-109
	1:64	94	90-101
细胞上清	1:8	97	94-100
	1:16	96	95-96
细胞裂解液	1:128	101	97-108
组织匀浆	1:8	105	93-113
	1:16	102	97-108

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Tie-2的浓度。

样本类型	平均值 (ng/mL)	范围 (ng/mL)
小鼠血清 (n=16)	12.9	12.9-24.4

细胞上清 - 取小鼠肺组织、肾组织和肝组织，用1倍PBS冲洗，冰冻保存。然后用组织匀浆机将组织匀浆，并将其接种到含有RPMI 1640的培养基中，RPMI 1640中添加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。小鼠肺细胞培养2 d，小鼠肾细胞和肝细胞培养3 d。取等量细胞培养上清液，检测小鼠Tie-2水平。小鼠肺细胞培养上清中Tie-2水平为2757.0 pg/mL，小鼠肾细胞培养上清中为247.2 pg/mL，小鼠肝细胞培养上清中为308.6 pg/mL。

裂解液

	小鼠 Tie-2 (ng/mL)	总蛋白 (mg/mL)
NIH/3T3 细胞裂解液	1.1	1.4
Neuro-2a 细胞裂解液	1.7	1.5
小鼠肺组织裂解液	217.7	5.9
小鼠肾组织裂解液	54.1	8.4
小鼠脾组织裂解液	10.1	2.9
小鼠心组织裂解液	6.8	2.2

组织匀浆

	小鼠 Tie-2 (pg/mL)	总蛋白 (mg/mL)
小鼠肝组织匀浆	6,870.6	3.3
小鼠脾组织匀浆	6,043.0	2.3
小鼠心组织匀浆	1,680.5	1.4

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Tie-2的灵敏度为7.6 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4倍，细胞裂解液样本预先稀释8倍。)

		小鼠血清	细胞上清	细胞裂解液	组织匀浆
1:2	均值 (%)	100	100	100	100
	范围 (%)	-	-	-	-
1:4	均值 (%)	114	97	85	96
	范围 (%)	113-114	95-99	83-87	90-102
1:8	均值 (%)	126	96	91	95
	范围 (%)	125-127	95-97	89-93	84-105
1:16	均值 (%)	127	106	99	99
	范围 (%)	110-127	93-119	91-106	87-112

9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组小鼠Tie-2，加入50 ng/mL以下细胞因子，无明显交叉反应。

Mouse:

VEGF

IL-6

TNF- α

IL-5

IL-4

IL-2

IL-7

MIP-1 β

十：参考文献

1. Fukuhara, Shigetomo et al. Nature cell biology vol. 10,5 (2008): 513-26.
2. Milam, Katelyn E, and Samir M Parikh. Tissue barriers vol. 3,1-2 (2015) e957508.