

小鼠 PD-1 ELISA Kit AZ0600 AZ0601

描述:

程序性死亡受体 1, 也称为 PD-1 和 CD279 (抗原分化簇 279), 是一种含有 268 个氨基酸的 I 型膜蛋白。PD-1 是免疫受体 CD28/CTLA-4 家族的成员之一, 介导调节免疫应答的信号通路。它是细胞表面的蛋白, 可以通过下调免疫系统和抑制 T 细胞炎症活性来促进自身耐受性, 进而在调节免疫系统对人体细胞的反应中起作用。PD-1 缺陷小鼠在外周耐受性方面存在缺陷, 并自发发生自身免疫性疾病。而在 CD8⁺T 细胞上 PD-1 过表达则是 T 细胞衰竭的信号之一。

原理:

试剂盒采用双抗体夹心酶联免疫吸附检测技术。特异性抗小鼠 PD-1 抗体预包被在高亲和力的酶标板上。酶标板孔中加入标准品、待测样本和生物素化的检测抗体, 经过孵育, 样本中存在的 PD-1 与固相抗体和检测抗体结合。洗涤去除未结合的物质后, 加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素 (Streptavidin-HRP)。洗涤后, 加入显色底物 TMB, 避光显色。颜色反应的深浅与样本中 PD-1 的浓度成正比。加入终止液终止反应, 450nm 波长 (参考波长 570-630nm) 测定吸光度值。

组成:

试剂盒保存于 2-8°C, 有效期标注于标签上。只有恰当保存的试剂才是有保证的。如果试剂盒的组分需要再次使用, 请确保上一次使用之后没有被污染。

组分	规格	规格	保存温度
预包被酶标板	48T	96T	4° C
标准品	1vial	2vials	-20° C
检测抗体	1vial	1vial	4° C
辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素	1vial	1vial	4° C
10×检测缓冲液	5ml	5ml	4° C
显色底物 TMB	6ml	11ml	4° C
终止液	11ml	11ml	4° C
20×洗液	50ml	50ml	4° C
标准品稀释液	5ml	5ml	4° C
封板膜	6 个	6 个	常温或 4° C

检测步骤

1. 样本采集与贮存

细胞培养上清

300×g 离心 10 分钟去除沉淀物，即刻检测，或者分装，-20℃ 以下贮存。

血清样本

离心管收集血清。血样凝集 30 分钟后，1,000×g 离心 10 分钟。吸取血清样本之后即刻检测，或者分装，-20℃ 以下贮存。

血浆样本

EDTA、枸橼酸钠或肝素抗凝收集血浆样本。1,000×g 离心 30 分钟收集样本。即刻检测，或者分装，-20℃ 以下贮存。

本试剂盒可能适用于其它生物学样本。细胞培养上清、血清和血浆已经过验证。

注意：检测前，样本中可见的沉淀必须去除。不要使用严重溶血或高血脂的样本。样本应分装并贮存于-20℃，以避免样本活性的丢失。如果在 24 小时内检测。样本可以存放在 2-8℃。避免样本的反复冻融。在检测前，冷冻样本应缓慢地恢复至室温，轻柔地混匀。

2. 样本准备

如果样本需要稀释，请用试剂盒提供的 1×检测缓冲液稀释血清/血浆样本，用细胞培养基稀释细胞培养上清。

3. 试剂准备

检测前请将所有的试剂、样本恢复至室温。

如果浓缩的试剂出现结晶，37℃ 温浴，直至结晶全部溶解。

1×洗液

吸取 20×浓缩洗液 50ml 至 1L 的量筒，加蒸馏水至 1,000ml，轻轻混匀，避免泡沫。转移至干净瓶内。2-25℃ 贮存，1×洗液可稳定保存 30 天。

1×检测缓冲液

吸取 10×浓缩检测缓冲液 5ml 至 100ml 量筒，加蒸馏水至 50ml，轻轻混匀，避免泡沫。2-8℃ 贮存，1×检测缓冲液可稳定保存 30 天。

检测抗体

稀释前充分混匀。根据标准品和待检样本的数量，用 1×检测缓冲液按 1: 100 稀释浓缩的检测抗体。

注意：请在 30 分钟内使用稀释后的检测抗体。

辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素

稀释前充分混匀。根据标准品和待检样本的数量，用 1×检测缓冲液按 1: 100 稀释浓缩的辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素。

注意：请在 30 分钟内使用稀释后的辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素。

标准品

开盖前短暂离心，用蒸馏水重溶标准品，重溶体积标注于标准品的标签上。轻柔地涡旋震荡，确保充分混匀，重溶后标准品的浓度为 10,000pg/ml。重溶后静置 10 -30 分钟。稀释前充分混匀。请使用聚丙烯管进行标准品稀释。

血清/血浆样本标准曲线的制备：

取 230 μ l 浓缩的标准品, 加入 230 μ l 标准品稀释液, 作为标准曲线的最高浓度(5000pg/ml)。在每一个试管中加入 230 μ l 标准品稀释液。使用高浓度标准品做 1:1 系列稀释。每次移液时, 请确保充分混匀。以标准品稀释液作为标准曲线的零浓度。

4. 操作步骤

检测之前请将所有的试剂、样本平衡至室温。

- 1) 准备好所有需要的试剂及工作浓度标准品。
- 2) 将不需要的板条拆卸下来, 放回装有干燥剂的铝箔袋, 重新封好封口。
- 3) 浸泡酶标板: 加入 300 μ l 1 \times 洗液静置浸泡 30 秒。为了获得理想的实验结果浸泡是必须的。弃掉洗液之后, 在吸水纸上将微孔板拍干。洗板完成之后, 请立即使用微孔板, 不要让微孔板干燥。
- 4) 加标准品: 标准品孔加入 100 μ l 2 倍比稀释的标准品。空白孔加入 100 μ l 标准品稀释液(血清/血浆样本)或培养基(细胞培养上清样本)。
- 5) 加样本: 血清/血浆: 样本孔加入 80 μ l 1X 检测缓冲液和 20 μ l 样本。细胞培养上清: 样本孔加入 100 μ l 细胞培养上清。
- 6) 加检测抗体: 每孔加入 50 μ l 稀释的检测抗体 (1:100 稀释)。保证步骤 4、5、6 连续加样, 不要间断。加样过程在 15 分钟内完成。
- 7) 孵育: 使用封板膜封板。300 转/分钟振荡, 室温孵育 2 小时。
- 8) 洗涤: 弃掉液体, 每孔加入 300 μ l 洗液洗板, 洗涤 6 次。每次洗板, 在吸水纸上拍干。为获得理想的实验性能, 必须彻底移除残留液体。
- 9) 加酶孵育: 每孔加入 100 μ l 稀释的辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素 (1:100 稀释)。
- 10) 孵育: 使用新的封板膜封板。300 转/分钟振荡, 室温孵育 45 分钟。
- 11) 洗涤: 重复步骤 8。
- 12) 加底物显色: 每孔加入 100 μ l 显色底物 TMB, 避光, 室温孵育 5-30 分钟。
- 13) 加终止液: 每孔加入 100 μ l 终止液。颜色由蓝色变为黄色。如果颜色呈现绿色或者颜色的变化明显不均匀, 请轻轻叩击板框, 充分混匀。
- 14) 检测读数: 在 30 分钟之内, 使用酶标仪进行双波长检测, 测定 450nm 最大吸收波长和 570nm 或 630nm 参考波长下的 OD 值。校准后的 OD 值为 450nm 的测定值减去 570nm 或 630nm 的测定值。仅使用 450nm 测定会导致 OD 值偏高, 并且准确度降低。

操作步骤简化版:

- 1) 准备所有的试剂和梯度稀释的标准品。板条加入 300 μ l 1 \times 洗液静置浸泡 30 秒。
- 2) 标准品孔加入 100 μ l 2 倍比稀释的标准品。空白孔加入 100 μ l 标准品稀释液(血清/血浆样本)或培养基(细胞培养上清样本)。
- 3) 血清/血浆: 样本孔加入 80 μ l 1 \times 检测缓冲液和 80 μ l 样本。细胞培养上清: 样本孔加入 100 μ l 细胞培养上清。
- 4) 每孔加入 50 μ l 1:100 稀释的检测抗体。步骤 2、3、4 在 15 分钟内完成。
- 5) 封膜, 室温孵育 2 小时。
- 6) 洗涤 6 次。
- 7) 每孔加入 100 μ l 1:100 稀释的辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素。

- 8) 封膜, 室温孵育 45 分钟。
- 9) 洗涤 6 次。
- 10) 每孔加入 100 μ l 显色底物, 避光, 室温孵育 5 - 30 分钟。
- 11) 每孔加入 100 μ l 终止液。
- 12) 30 分钟内, 在 450 nm 波长检测 OD 值, 参考波长 570 nm 或 630 nm。

注意事项

- 1) 所有的化学试剂理应被认为具有潜在危害。
- 2) 推荐只有经过良好实验室培训的工作人员方可操作本试剂盒。操作时请佩戴合适的防护设施, 例如白大衣、乳胶手套、安全眼镜等。
- 3) 请避免试剂接触皮肤和眼睛。如不慎接触, 请立即用大量清水清洗。
- 4) 试剂盒中的终止液为酸性溶液, 在使用终止液时, 请佩戴防护服, 及防护眼睛、手及面部的设施。
- 5) 本试剂盒用于科学研究, 不能用于诊断治疗。
- 6) 请不要使用其他批号或其他来源的试剂替代本试剂盒中的试剂。
- 7) 请不要使用过期的试剂。
- 8) 在试剂盒的贮存或孵育过程请避免强光照射。
- 9) 在操作试剂盒或处理样本的区域请不要饮食。
- 10) 不要让试剂或样本接触皮肤和粘膜。
- 11) 在操作试剂盒或处理样本时请佩戴乳胶或一次性手套。
- 12) 显色底物避免与氧化试剂和金属接触。
- 13) 避免气溶胶的产生。
- 14) 为了避免微生物的污染, 以及试剂与样本间的交叉污染, 请使用一次性枪头。
- 15) 使用干净的容器配制试剂。
- 16) 暴露于酸性环境会抑制结合。
- 17) 试剂的准备必须使用蒸馏水或去离子水。
- 18) 显色底物在使用之前必须平衡至室温。
- 19) 样本可能含有传染性病原体, 处理样本和可能的污染材料的首选方法是 121.5 $^{\circ}$ C, 最少 1 小时。
- 20) 液体废弃物的处理。不含酸的液体废弃物, 加入 1.0%的次氯酸钠, 浸泡 30 分钟。含酸的液体废弃物, 请先中和, 再加入次氯酸钠。