



## 组分

	CAT	Volume
① CA (capture antibody 100×)	DSEM004405/15CA	1 vial
② S (Standard)	DSEM0044S	1 vial
③ DA (Detect Antibody 100×)	DSEM004405/15DA	1 vial
④ SH (Streptavidin-HRP 100×)	DSSH0105/15	1 vial

### 预期用途

用于开发夹心法ELISA以测定天然Mouse RANKL/TRANCE/TNFSF11。推荐的试剂稀释液可能适用于大多数细胞培养上清液、血清和血浆样品。因基质效应的存在，试剂稀释液会影响免疫测定的性能。优化样本的稀释液，诸如测定血清和血浆的复杂基质，可以提高在该测定中的性能。

- 试剂按照本说明书中的说明进行制备。
- 使用推荐的微孔板、缓冲液、稀释剂、基质和溶液。

## 试剂准备

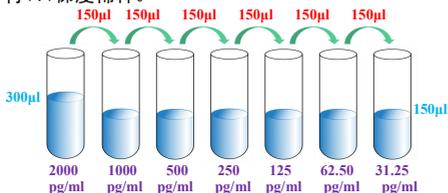
使用前将所有试剂置于室温，标准蛋白溶解之后至少静置15分钟。其他工作液应现配现用。

**1X Mouse RANKL/TRANCE/TNFSF11捕获抗体：**将浓缩的捕获抗体用不含载体蛋白的PBS稀释100倍，充分混匀后备用。

**1X 生物素化Mouse RANKL/TRANCE/TNFSF11检测抗体：**将浓缩检测抗体用**检测缓冲液(AB)**稀释100倍，充分混匀后备用。

**1X 链霉亲和素-HRP：**将浓缩链霉亲和素-HRP用**检测缓冲液(AB)**稀释100倍，充分混匀后备用。

**Mouse RANKL/TRANCE/TNFSF11标准品：**用1 ml 去离子水重溶标准品S，至少静置15分钟，使其充分溶解后混匀，浓度为20000 pg/ml。取30 μl浓度为20000 pg/ml标准品S加至270 μl**检测缓冲液(AB)**中，充分混匀，终浓度为2000 pg/ml，再按下图进行1:1梯度稀释。



## 操作步骤

### 板条准备

- ① 用不含载体蛋白的PBS将捕获抗体稀释100倍，然后在96孔微孔板中加入100 μl/孔**(1X捕获抗体)**，用**封板膜(SF)**密封板，在4°C过夜包被。
- ② 将板内液体弃去并将平板倒置，在吸水纸上拍干。
- ③ 每个孔中加入250 μl**封闭液**，室温静置2小时封闭。
- ④ 重复步骤2。

### 实验流程

#### 检测之前请将所有的试剂、样本恢复至室温

- 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，放回铝箔袋，重新封好封口。
- ③ 每孔加入50 μl**检测缓冲液(AB)**。
- ④ 加入10 μl的**标准品(S)**、**样本**。保证连续加样，请不要间断。加样过程在15分钟内完成。
- ⑤ 每孔加入50 μl**检测抗体(DA)**。
- ⑥ 使用**封板膜(SF)**封板。500转/分钟振荡，室温孵育1小时。
- ⑦ 弃掉孔内液体，每孔加入300 μl**洗液**洗板，洗涤4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。
- ⑧ 每孔加入100 μl**辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(SH)**。
- ⑨ 使用**封板膜(SF)**封板。500转/分钟振荡，室温孵育30分钟。
- ⑩ 重复步骤7。
- ⑪ 每孔加入100 μl**显色底物TMB(TS)**，室温孵育5-30分钟。
- ⑫ 每孔加入100 μl**终止液(SS)**。
- ⑬ 在30分钟之内，将**酶标板**用450 nm波长测定OD值，校正波长设定为570 nm或者630 nm。

## 所需的其他材料和解决方案

DuoSet 辅助试剂盒 (5 板) :

包含 96 孔微孔板、封板膜、显色液、终止溶液、包板缓冲液 (PBS)、洗涤缓冲液和检测缓冲液。

上面列出的部件可以单独购买：

**96孔微孔板:** YOUKE Life, Catalog # DSEP01

**封板膜:** YOUKE Life, Catalog # DSSF01。

**包板缓冲液:** 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8.1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2-7.4, 0.2μm过滤。YOUKE Life, Catalog # DSCB01。

**检测缓冲液:** 0.5%BSA, 0.05%Tween20, PBS溶液。YOUKE Life, Catalog # DSAB01。

**封闭液:** YOUKE Life, Catalog # DSBB01。

**洗涤液:** 0.05%Tween20, PBS溶液, pH 7.2-7.4。YOUKE Life, Catalog # DSWB01。

**底物显色液:** TMB。YOUKE Life, Catalog # DSTS01。

**终止溶液:** 0.5mol/ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>。YOUKE Life, Catalog # DSSS01。

### 注意事项

- 此试剂盒一起使用的终止溶液是酸性溶液。
- 佩戴防护手套、防护服、眼睛和面部防护用品。处理后彻底洗手。

## 结果计算

计算标准品、对照品和样本的平均 OD 值，然后减去零浓度标准品的 OD 值。

标准品浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，用计算机软件进行回归拟合生成标准曲线。回归分析确定最佳拟合曲线。浓度值和 OD 取对数拟合，可以对标准曲线直线化。直线化的过程能够产生较多的数据，但会降低一些准确度。

如果样本进行了稀释，那么由标准曲线计算的浓度值，必须乘以稀释倍数。

## 典型数据

每一次的检测，每一块微孔板都必须设立标准曲线。下方标准曲线仅作为示例展示。

