

Mouse RAGE ELISA Kit

目录号：ABC0050-48T

产品信息

产品名称	产品编号	规格
Mouse RAGE ELISA Kit	ABC0050-48T	48T
	ABC0050-96T	96T

产品简介

糖基化终产物受体(Receptor for Advanced Glycation End Products, RAGE)是细胞表面分子免疫球蛋白超家族的成员,是一种具有多种配体的跨膜信号转导受体,包括可以启动和延续免疫反应的警报蛋白。可以介导晚期糖基化终产物(AGE)相互作用,与多种慢性炎症有关。RAGE在正常生理条件下以低水平表达,但在慢性炎症下由于各种RAGE配体的积累而高度上调。RAGE与阿尔茨海默病、糖尿病血管并发症、心血管疾病和癌症进展相关。Mouse RAGE ELISA Kit通过双抗体夹心酶联免疫吸附技术,体外定量检测小鼠血清、血浆、细胞培养上清或其它相关液体中的RAGE,可同时检测天然的和重组的小鼠RAGE。

储存与运输

冰袋运输;4℃保存,有效期12个月;开封后需在4周内用完。

需准备的材料设备

1. 能够检测450 nm吸光度的酶标仪,参考波长630 nm(建议参考仪器使用说明提前预热);
2. 单道或多道移液器及吸头,加样槽,离心管;
3. 蒸馏水或去离子水;
4. 干性滤纸或吸水纸;
5. 涡旋混匀仪,微孔板振荡器。

样本的采集与保存

1. **血清样本:**采集血样,静置30分钟,血液凝固。取液体部分进行离心分离,1000 g离心15分钟,吸取上清即可检测,或者分装,分装上清置于-20℃以下保存,避免反复冻融。
2. **血浆:**用EDTA、枸橼酸钠或肝素作为抗凝剂收集血浆样本,并将样本在采集后的30分钟内于2-8℃1000 g离心15分钟,吸取上清即可检测,或者分装,分装上清置于-20℃以下保存,避免反复冻融。
3. **细胞培养上清:**300 g离心10分钟,吸取上清即可检测,或者分装,分装上清置于-20℃以下保存,避免反复冻融。

注意:

Mouse RAGE ELISA Kit

目录号：ABC0050-48T

1. 样本如果浑浊，必须离心去除沉淀物，不适用严重溶血或高血脂的样本。
2. 以上样本均需密封保存，4℃保存不超过1周，-20℃保存不超过1个月，-80℃保存不超过2个月。
3. 冷冻样本使用前应缓慢平衡至室温。

试剂的配制

1. 提前20分钟将试剂盒及样本从冰箱中取出，平衡至室温。按实验需求取出本次实验所需板条和试剂，每次检测后剩余试剂请及时置于4℃保存。

2. 1×洗液配制：取25×浓缩洗液30mL至1L的量筒，加蒸馏水或去离子水至750mL，轻轻混匀。转移至干净瓶内。

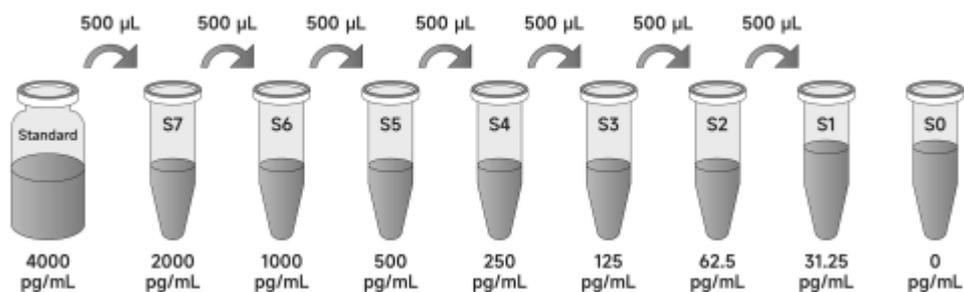
3. 标准品配制：将稀释液A按照标签标注体积加入标准品中，轻柔涡旋振荡，确保充分混匀。重溶后的标准品浓度为4000pg/mL，即为浓缩的小鼠RAGE标准品。重溶后静置10分钟，稀释前充分混匀。

a) 血清/血浆样本标准曲线制备：

充分混匀重溶后的标准品，取500μL浓缩的小鼠RAGE标准品，加入500μL稀释液A，作为标准曲线的最高浓度S7（2000pg/mL）。取6个1.5mL离心管（S1-S6）依次排列，各加入500μL稀释液A。吸取500μL S7（2000pg/mL）标准品到第一个离心管S6中，轻轻吹打混匀。从S6中吸取500μL到第二个离心管S5中，轻轻吹打混匀。以此类推进行标准品的倍比稀释。S0为稀释液A。

b) 细胞培养上清样本标准曲线制备：

充分混匀重溶后的标准品，取500μL浓缩的小鼠RAGE标准品，加入500μL细胞培养基，作为标准曲线的最高浓度S7（2000pg/mL）。取6个1.5mL离心管（S1-S6）依次排列，各加入500μL细胞培养基。吸取500μL S7（2000pg/mL）标准品到第一个离心管S6中，轻轻吹打混匀。从S6中吸取500μL到第二个离心管S5中，轻轻吹打混匀。以此类推进行标准品的倍比稀释。S0为细胞培养基。



4. 1×检测抗体配制：检测抗体短暂离心，用稀释液B按照1:100倍稀释至工作浓度。混匀制成1×检测抗体工作液，临用前配制。

5. 1×SA-HRP配制：SA-HRP短暂离心，用稀释液B按照1:100倍稀释至工作浓度。混匀制成1×SA-HRP工作液，临用前配制。

Mouse RAGE ELISA Kit

目录号：ABC0050-48T

注意：

1. 未开封的试剂盒：未拆封的试剂盒可整盒保存于 4℃，有效期 12 个月。
2. 已开封的试剂盒：有效期 4 周，冻干标准品溶解后不能再次使用，剩余试剂及时放置 4℃ 保存。此外，请将未使用的板条用包含干燥剂的铝箔袋装好，并拉紧密封铝箔袋，置于 4℃ 保存。

操作步骤

1. **加样：**分别设标准孔、待测样本孔、空白孔。用稀释液 A 稀释标准品及样本，设标准孔 7 孔 (S1-S7)，每孔依次加入 100 μL 不同浓度的标准品，空白孔每孔加入 100 μL 稀释液 A，余孔每孔加入待测样品 100 μL，封板膜封板，100-300 rpm 振荡（保证每孔溶液不洒出且能充分混匀即可），室温振荡孵育 2 小时；
注意：请先查阅相关文献确定样本中待检测蛋白的大致浓度，如果该浓度大于或者小于本试剂盒的最高或者最低标准品浓度，请进行适当稀释或浓缩后再检测。
2. **洗板：**自动洗板或手工洗板，每孔洗涤液为 300 μL，注入与吸出间隔 15-30 秒。洗板 5 次。最后一次洗板完成后将酶标板倒扣在吸水纸上适当用力拍干，弃去孔内液体；
3. **加检测抗体：**用稀释液 B 将检测抗体稀释至工作浓度，每孔加 1×检测抗体工作液 100 μL（临用前配制），更换新的封板膜封板，100-300 rpm 振荡（保证每孔溶液不洒出且能充分混匀即可），室温振荡孵育 1 小时；
4. **洗板：**重复步骤 2；
5. **加 SA-HRP：**用稀释液 B 将 SA-HRP 稀释至工作浓度，每孔加 1×SA-HRP 工作液（临用前配制）100 μL，更换新的封板膜封板，100-300 rpm 振荡（保证每孔溶液不洒出且能充分混匀即可），室温振荡孵育 30 分钟；
6. **洗板：**重复步骤 2；
7. **加显色液 TMB：**每孔加 TMB 底物溶液 90 μL，更换新的封板膜，室温避光显色（反应时间应控制在 10-30 分钟，不要超过 30 分钟。当标准品的前 3-4 孔有明显的梯度蓝色，后 3-4 孔梯度不明显时，即可终止）；
8. **加终止液：**每孔加终止溶液 50 μL，终止反应，此时蓝色立转黄色。终止液的加入顺序应尽量与底物溶液的加入顺序相同。如出现颜色不均一情况，请轻轻晃动酶标板以使溶液混合均匀；
9. **读数：**在确保酶标板底部无水滴及孔内无气泡后，10 分钟内用检测波长 450 nm 读值。推荐用双波长即检测波长 450 nm、参考波长或校正波长 630 nm 同时读值，仅使用 450 nm 读值会降低准确度。

注意事项

1. 试剂盒按说明书保存，使用前室温平衡 20-30 分钟。
2. 标准品为冻干粉，所需加入的稀释液体积及稀释倍数，请严格按照试剂盒说明书进行操作。为保证标准品的精确性，标准品配制使用后，如果有剩余请勿再次使用。
3. 25×洗液在低温下可能有结晶，如果发现结晶，请 37℃ 温育使结晶完全溶解后再配制成工作液。

Mouse RAGE ELISA Kit

目录号：ABC0050-48T

4. TMB 对人体有刺激性，操作时请注意适当防护，避免试剂直接接触皮肤和眼睛。如不慎接触，请立即用大量清水清洗。
5. 试剂盒中的终止液为酸性溶液，操作时请注意适当防护，避免试剂直接接触皮肤和眼睛。如不慎接触，请立即用大量清水清洗。
6. 如果发现显色液 TMB 出现混浊或颜色变成蓝色，请立即停止使用。
7. 不宜混用不同批号的试剂盒组份，每批次试剂盒均经过独立测试，不能混用。
8. 本试剂盒的操作在室温进行，要求严格控制室温在 25-28℃。温度低于 25℃会导致最终检测到的吸光度显著下降。
9. 检测标准品和样品时建议设置重复孔，以确保检测结果的可信度。
10. 在试剂盒的贮存或孵育过程中请避免强光照射。
11. 加样过程中需避免气泡的产生。
12. 在操作试剂盒或处理样本时请穿实验服，佩戴乳胶或一次性手套。
13. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅。
14. 为了避免微生物的污染及试剂与样本间的交叉污染，加样时请注意每个样品或标准品必须更换枪头。
15. 洗涤过程中反应孔中残留的洗涤液应在滤纸上充分拍干，滤纸上看不到水印。勿将滤纸直接放入反应孔中吸水。

结果分析

1. 结果计算

为了获得更准确的实验结果，建议标准品及样本进行复孔检测。计算标准品和样本的平均 OD 值，然后减去空白孔的 OD 值。

以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，相关系数 R 值越接近 1，拟合效果越好。回归分析确定最佳拟合曲线。

代入样本检测 OD 值，计算出样本浓度，若样本进行了稀释，应乘以稀释倍数，即为样本的实际浓度。通过对浓度值和 OD 值取对数拟合，可以对标准曲线进行线性化。此过程可能可以得到更多样本的浓度，但数据的准确度会降低。

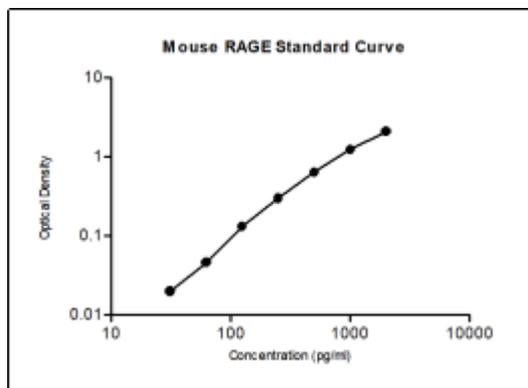
2. 典型数据

每次检测每块酶标板都必须设立单独的标准曲线。由于实验操作条件的不同（如操作者、洗板条件和温度条件等），每次实验标准曲线的 OD 值会有所差异。说明书提供的标准曲线仅供参考。

pg/mL	OD		Average	Corrected
2000	2.128	2.166	2.147	2.087
1000	1.291	1.296	1.294	1.234

Mouse RAGE ELISA Kit
目录号 : ABC0050-48T

500	0.706	0.696	0.701	0.641
250	0.359	0.359	0.359	0.299
125	0.185	0.198	0.192	0.132
62.5	0.101	0.110	0.106	0.046
31.25	0.078	0.081	0.080	0.020
0	0.061	0.058	0.060	



检测步骤概要

1. 实验前按说明书准备标准品、试剂及样本；
2. 加样（标准品或样本）100 μ L/孔，室温振荡 2 小时；
3. 洗涤 5 次后拍干，加检测抗体工作液 100 μ L/孔，室温振荡 1 小时；
4. 洗涤 5 次后拍干，加 SA-HRP 工作液 100 μ L/孔，室温振荡 30 分钟；
5. 洗涤 5 次后拍干，加 TMB 底物 90 μ L/孔，室温避光孵育 10—30 分钟；
6. 加终止液 50 μ L/孔；
7. 10 分钟内于 450 nm 波长处检测 OD 值，参考波长 630 nm。