

# 大鼠B7-2酶联免疫吸附测定试剂盒

Rat B7-2/CD86 ELISA Kit

本产品需冰袋运输。保存于4℃，保质期6个月；保存于-20℃，保质期12个月。

## 产品参数

|      |                        |
|------|------------------------|
| 货号   | HJ310                  |
| 规格   | 96次                    |
| 检测范围 | 62.5 pg/mL~4,000 pg/mL |
| 敏感性  | 10 pg/mL               |
| 特异性  | 系统和其它因子无交叉反应           |
| 样本类型 | 大鼠血清、血浆、体液、组织匀浆或细胞培养上清 |

## 产品简介

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法检测样品中大鼠 B7-2 的浓度。大鼠 B7-2 捕获抗体已经预包被于酶标板上，当加入样品或标准品时，其中的大鼠 B7-2 会与捕获抗体结合，而其它游离成分则会通过洗涤被除去。接着，再加入生物素标记的大鼠 B7-2 抗体后，抗大鼠 B7-2 抗体与大鼠 B7-2 接合，形成夹心的免疫复合物，其它游离成分则通过洗涤被除去。随后加入酶复合物，生物素与酶复合物特异性结合，这样酶复合物上的 HRP 就与夹心的免疫复合物连接起来，而其它游离成分则通过洗涤被除去。最后加入显色剂，若样品中存在大鼠 B7-2，则会形成免疫复合物，其上连接的 HRP 会催化无色的显色剂氧化生成蓝色物质，而后加入终止液，最终产物呈黄色。通过酶标仪检测，读取 450 nm 处的 OD 值，大鼠 B7-2 浓度与 OD450 值之间呈正比，通过检测标准品绘制标准曲线，对照未知样品中 OD 值，即可计算出样品中大鼠 B7-2 的浓度。

## 背景简介

B7-2，也被称为 CD86，是一种在免疫反应中起重要作用的共刺激分子。它与 B7-1(CD80) 同属于 B7 家族，但具有一些不同的生物学特性。B7-2 主要传达正向共刺激信号，这对于 T 细胞的活化和增殖是必需的。B7-2 在抗原激活的 APC（抗原呈递细胞）上表达上调，这是它在免疫反应中的一个重要特点。

与 B7-1 不同，B7-2 不传达抑制信号。相反，B7-2 与 CD28 受体结合，帮助维持 T 细胞的活化状态，而不像 B7-1 与 CTLA-4 结合，后者可能导致 T 细胞的无反应性或抑制。B7-2 的这些功能使其在疫苗开发、免疫治疗和自身免疫疾病的研究中成为了一个重要的靶点。



## 产品内容

| 组分                | 体积或数量                |
|-------------------|----------------------|
| 大鼠B7-2预包被板        | 8孔条×12个              |
| 样品稀释液             | 30 mL                |
| 重组大鼠B7-2标准品(冻干)   | 2支(10 ng/支)          |
| 生物素标记大鼠B7-2抗体     | 130 $\mu$ L(效价1:100) |
| 抗体稀释液             | 12 mL                |
| 酶复合物(HRP标记的链霉亲和素) | 130 $\mu$ L(效价1:100) |
| 酶复合物稀释液           | 12 mL                |
| 浓缩洗涤液(25×)        | 30 mL                |
| 显色剂TMB            | 10 mL                |
| 终止液               | 10 mL                |
| 封板胶纸              | 4张                   |

## 操作步骤

### 样品制备

#### 1. 根据样品种类选择相应的处理方法：

- 细胞上清：**将细胞培养上清液100~500×g离心5 min，去除悬浮物后即可；
- 血清样品：**将全血在室温下静置0.5~2 h，待其自然凝固并析出血清后，离心取黄色上清即可(4℃，1,000~2,000×g，10 min)，注意请勿吸取沉淀，制备好的血清需置于冰上待用，请勿在其中添加任何防腐剂或抗凝剂；
- 血浆样品：**使用EDTA对全血进行抗凝处理后，混合均匀置于冰上，离心取黄色上清即可(4℃，1,000~2,000×g，10 min)，注意请勿吸取沉淀，制备好的血浆需置于冰上待用；
- 组织匀浆/体液：**离心去除沉淀即可。

注意：① 若待测样品无法及时检测，样品制备完成后，请分装冻存于-20℃，避免反复冻融；  
② 请保证待测样品清澈透明，检测前如发现样品中有悬浮物，需通过离心去除；  
③ 为了保证检测结果准确，请勿使用溶血、黄疸、高血脂或污染的样品。

#### 2. 稀释样品

查阅相关文献，预估样品中待测因子的含量，从而确定适当的稀释倍数，使稀释后样品中待测因子的浓度处于ELISA试剂盒的最佳检测范围。根据待测因子含量的不同，分别采取不同的稀释方案：

- 待测因子含量在40~400 ng/mL范围内，一般按1:100稀释，即向297  $\mu$ L样品稀释液中加入3  $\mu$ L样品；
- 待测因子含量在4~40 ng/mL范围内，一般按1:10稀释，即向225  $\mu$ L样品稀释液中加入25  $\mu$ L样品；
- 待测因子含量在62.5~4,000 pg/mL范围内，一般按1:2稀释，即向100  $\mu$ L样品稀释液中加入100  $\mu$ L样品；
- 待测因子含量≤62.5 pg/mL，样品一般无需稀释。

以上方案仅供参考，实验中请详细记录样品的稀释方法。



## 检测准备工作

3. 试剂盒自 4℃冰箱取出后,请置于室温平衡 20 min; 如从 -20℃取出,各组分需彻底融化后再平衡 20 min; 检测完成后,剩余试剂请及时置于 4℃或 -20℃保存;
4. 将 **浓缩洗涤液(25×)** 用双蒸水或去离子水稀释成 1×洗涤液;
5. 重组大鼠 B7-2 标准品的稀释和使用(在使用前 2 h 内准备, 室温操作, **请严格控制在 25~28℃**)
  - ① 配制 10 ng/mL 标准品: 取 1 mL 样品稀释液加入标准品管内,盖好后静置 15 min 以上,然后反复颠倒 / 搓动以助溶解;
  - ② 配制 4,000 pg/mL 标准品: 取 400  $\mu$ L 10 ng/mL 的标准品加入有 600  $\mu$ L 样品稀释液的 EP 管中,混匀,做上标记;
  - ③ 按下表将 4,000 pg/mL 标准品用样品稀释液进行倍比梯度稀释。(最高浓度为 4,000 pg/mL,将标准品稀释液作为浓度 0 pg/mL。)

| 管号 | 稀释液用量( $\mu$ L) | 复溶后标准品用量( $\mu$ L) | 标准品的最终浓度(pg/mL) |
|----|-----------------|--------------------|-----------------|
| A  | 0               | 1,000              | 4,000           |
| B  | 300             | 300(从A管中取)         | 2,000           |
| C  | 300             | 300(从B管中取)         | 1,000           |
| D  | 300             | 300(从C管中取)         | 500             |
| E  | 300             | 300(从D管中取)         | 250             |
| F  | 300             | 300(从E管中取)         | 125             |
| G  | 300             | 300(从F管中取)         | 62.5            |
| H  | 300             | 0                  | 0               |

注意: 标准品复溶加样后, 剩余部分请丢弃。

6. 准备生物素标记大鼠 B7-2 抗体工作液
  - ① 按每孔需添加 100  $\mu$ L 抗体工作液, 计算其总用量 (为弥补操作中的损耗, 需多配制 100~200  $\mu$ L);
  - ② 按 1  $\mu$ L **生物素标记大鼠 B7-2 抗体** 添加 99  $\mu$ L **抗体稀释液** 的比例配制工作液, 轻轻混匀。
7. 准备酶复合物工作液 (需在使用前 1 h 内准备)
  - ① 按每孔需添加 100  $\mu$ L 酶复合物工作液, 计算其总用量 (为弥补操作中的损耗, 需多配制 100~200  $\mu$ L);
  - ② 按 1  $\mu$ L **酶复合物** 添加 99  $\mu$ L **酶复合物稀释液** 的比例配制工作液, 轻轻混匀。

## 检测流程

8. 通过计算确定一次实验所需的板条数, 取出所需板条放置于框架内, 多余的板条请放回铝箔袋密封, 保存于 4℃或 -20℃;  
注意: ① 标准品和样品建议做双复孔检测;  
② 每次实验均需绘制标准曲线。
9. 将用样品稀释液稀释后的样品和不同浓度标准品 (100  $\mu$ L/ 孔) 分别加入相应孔中, 用封板胶纸封住反应孔, 37℃孵育 90 min;  
注意: ① 请查阅相关文献确定样品中待检测蛋白的大致浓度, 若其大于本试剂盒标准曲线的最大标准品浓度, 请将样品适当稀释后再进行检测;  
② 整个加样过程不宜超过 10 min, 否则可能会影响检测结果。
10. 甩去酶标板内液体, 无需洗板, 将板倒扣在吸水纸上拍干;
11. 加入稀释后的生物素标记大鼠 B7-2 抗体工作液 (100  $\mu$ L/ 孔), 用封板胶纸封住反应孔, 37℃孵育 60 min;

12. 洗板 5 次, 每孔 1× 洗涤液用量为 300  $\mu\text{L}$ , 注入与吸出间隔 15~30 s, 洗完后将板倒扣在吸水纸上拍干;  
注意: 洗涤过程至关重要, 洗涤不充分会导致结果产生较大误差。
13. 加入稀释后的酶复合物 (100  $\mu\text{L}$ / 孔 ), 用封板胶纸封住反应孔, 37°C 避光孵育 30 min;
14. 洗板 5 次, 方法同步骤 12;
15. 加入 显色剂 TMB (100  $\mu\text{L}$ / 孔 ), 用封板胶纸封住反应孔, 避光 37°C 反应 10~25 min;  
注意: ① 在保存和使用时, 请勿将 TMB 接触氧化剂和金属;  
② 因实验室条件差异, 最佳显色时间会有所不同, 反应充分时肉眼可见标准品的前 3~4 孔有明显的梯度蓝色。
16. 加入 终止液 (100  $\mu\text{L}$ / 孔 ), 混匀后即刻使用酶标仪测量 OD450, 同时设定 540 nm 或 570 nm 作为校正波长, 即可计算得到校正吸光度值 (OD450-OD540 或 OD450-OD570);  
注意: 读取 OD 值建议在 10 min 内完成。

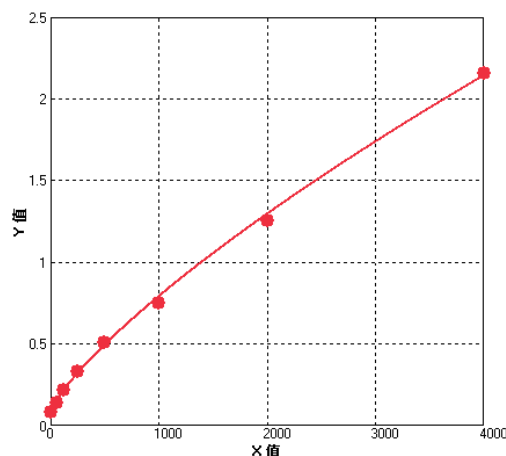
## 数据分析

17. 绘制标准曲线。以标准品浓度作横坐标, OD 值作纵坐标, 利用计算机软件作四参数逻辑 (4-PL) 曲线拟合创建标准曲线, 通过样品的 OD 值即可在标准曲线上计算出其相应浓度。  
注意: ① 复孔 OD 值在 20% 的差异范围内结果才有效, 复孔 OD 值取平均后可作为测量值;  
② 若样品 OD 值高于标准曲线上限, 应适当稀释后重测, 计算浓度时应乘以稀释倍数。

## 标准曲线范例

大鼠 B7-2 参考标准曲线

| 标准品浓度       | O.D.  |
|-------------|-------|
| 0 pg/mL     | 0.080 |
| 62.5 pg/mL  | 0.141 |
| 125 pg/mL   | 0.214 |
| 250 pg/mL   | 0.330 |
| 500 pg/mL   | 0.510 |
| 1,000 pg/mL | 0.751 |
| 2,000 pg/mL | 1.251 |
| 4,000 pg/mL | 2.153 |



注意: 本图仅供参考, 应以同次试验标准品所绘标准曲线计算样品含量。

## 注意事项

1. 浓缩洗涤液 低温情况下可能会出现结晶, 请水浴加热使结晶完全溶解后再配制工作液;
2. 严禁混用不同批号试剂盒的组分;
3. 加样过程请避免产生气泡, 实验操作过程中一定要保证试剂充分混匀, 否则会使结果产生较大误差;
4. 说明书中提到的室温条件, 请严格控制在 25~28°C;
5. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作;
6. 本产品仅限科研使用。