

人磷酸化 Tau-404蛋白 (p-tau404) ELISA

定量检测试剂盒说明书

- 货号: BNEK-H-631767
- 检测范围: 46.88~3000pg/ml
- 规格: 96T/48T
- 保存温度: 2-8℃
- 种属: 人
- 有效期: 6个月

产品仅供教研使用, 用于定量检测细胞培养上清、血清、血浆中人TREM2。

使用本产品之前, 必须完整阅读本说明书。仅供科研使用, 不能于临床诊断或治疗。

简介

人磷酸化 Tau-404 蛋白 (p-tau404) 是由 MAPT 基因编码的微管相关 Tau 蛋白在丝氨酸 404 位点经 GSK-3 β 、CDK5 等激酶催化发生病理性过度磷酸化形成的修饰亚型, 其异常修饰会导致 Tau 蛋白与微管结合能力显著下降、神经元骨架稳定性破坏与轴突运输障碍, 同时增强自身聚集倾向并逐步形成神经原纤维缠结, 在阿尔茨海默病进程中与神经变性程度、认知损伤进展高度相关, 是脑脊液及外周血中用于 AD 辅助诊断、病情评估与药物疗效监测的重要特异性生物标志物。本试剂盒用于体外定量检测血清、血浆、组织匀浆及相关液体样本中人磷酸化 Tau-404蛋白 (p-tau404) 的含量。

检测原理

本试剂盒采用双抗体一步夹心法酶联免疫吸附试验 (ELISA)。往预先包被人磷酸化 Tau-404蛋白 (p-tau404) 捕获抗体的包被微孔中, 依次加入标本、标准品、HRP标记的检测抗体, 经过温育并彻底洗涤。用底物TMB显色, TMB在过氧化物酶的催化下转化成蓝色, 并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的人磷酸化 Tau-404蛋白 (p-tau404) 呈正相关。用酶标仪在450nm 波长下测定吸光度 (OD 值), 计算样品浓度。

检测实验的局限性

本试剂盒仅供科研使用, 不能用于临床诊断或治疗。

试剂盒的使用期限不得超过试剂盒标签上的有效期。不要将试剂与其他批次或来源的试剂混合使用或替换使用。

如果样品产生的值高于最高标准, 则用测定稀释剂进一步稀释样品, 并重复测定。稀释剂、实验员、移液技术、洗涤技术、培养时间或温度以及试剂盒使用年限的任何变化都可能导致结果变化。

样本采集、处理和存储的变化可能会导致样本值的差异。

本试剂盒实验设计消除了不同生物样品中可能潜在的干扰因素的影响, 但并不能涵

盖所有潜在影响因素。不能排除存在其他干扰的可能性。

操作要点及注意事项

混合蛋白质溶液时，应始终避免起泡。为了避免交叉污染，在添加每个标准品、样品和试剂时应更换移液器枪头。此外，每种试剂应单独使用容器。

确保试剂不间断地添加到板孔中。为了确保准确的结果，在孵育步骤中需要粘合好封板膜。

当使用自动洗板机时，在加入洗涤缓冲液后加入30秒的浸泡期，或者在洗涤步骤之间将板旋转180度，可以提高测定精度。

显色剂应保持无色，直到添加到板中。确保显色剂不受光线照射。显色剂应从无色变为蓝色。

应按照与显色剂相同的顺序将终止液添加到板中。加入终止液后，孔中形成的颜色将从蓝色变为黄色。绿色的孔表示终止液未与基质溶液充分混合。

此试剂盒提供的终止液为稀硫酸溶液，具有一定腐蚀性，应谨慎操作。

该试剂盒中的某些成分含有防腐剂，可能会引起皮肤过敏反应，应佩戴口罩避免吸入薄雾。

显色剂B可能会引起皮肤、眼睛和呼吸道刺激，应佩戴口罩避免吸入薄雾。

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。

试剂盒组成及储存条件

名称	规格（96T）	规格（48T）	备注
孔酶标板	12 孔×8 条	12 孔×4 条	无
标准品	0.3mL*6 管	0.3mL*6 管	无
样本稀释液	6mL	3mL	无
检测抗体-HRP	10mL	5mL	无
0×洗涤缓冲液	25mL	15mL	说明书进行稀释
底物 A	6mL	3mL	无
底物 B	6mL	3mL	无
终止液	6mL	3mL	无
封板膜	2 张	2 张	无
说明书	1 份	1 份	无
自封袋	1 个	1 个	无

需要的其他材料

- 酶标仪，包含450nm测定波长，同时包含600-680nm校正波长更佳；
- 移液器及枪头；
- 蒸馏水或去离子水

- 100-1000 mL刻度量筒。
- 洗瓶、排枪或自动微孔板清洗机。
- 水平轨道微孔板振荡器，能够保持 500 ± 50 rpm的速度。
- 用于稀释标准品和样品的试管。

样品处理及要求

下面列出的样品收集和储存条件旨在作为一般性指导。样品稳定性尚未评估。

细胞培养上清液：在 $1000 \times g$ 下离心15分钟去除颗粒，立即进行测定或等分装样品，并将样品储存在 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 的温度下。避免重复冻融循环。（由于基质效应，细胞培养上清液样品建议预实验以确定稀释倍数）

血清：使用血清分离管，使样品在室温下凝结30分钟，然后在 $1000 \times g$ 下离心15分钟。立即取出血清并进行测定或等分装样品，将样品储存在 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 的温度下。避免重复冻融循环。（由于基质效应，血清样品建议2倍稀释。例如：50 μL 样品+50 μL 的1 $\times$ 稀释液）

血浆：使用EDTA或肝素作为抗凝剂收集血浆。收集后30分钟内，以 $1000 \times g$ 离心15分钟。立即测定或等分装样品，并将样品储存在 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 的温度下。避免重复冻融循环。（由于基质效应，血浆样品建议2倍稀释。例如：50 μL 样品+50 μL 的1 $\times$ 稀释液）

注：柠檬酸盐抗凝剂血浆未经验证可用于本试验，使用时应自行验证可行性。溶血的样品不适合用于该测定。

组织匀浆：用预冷的PBS(0.01M,pH=7.4)冲洗组织，去除残留血液（匀浆中裂解的红细胞会影响检测结果），称重后将组织剪碎。将剪碎的组织与对应体积的PBS（一般按1:9的重量体积比，比如1g的组织样品对应9mL的PBS，具体体积可根据实验需要适当调整，并做好记录。推荐在PBS中加入蛋白酶抑制剂）加入玻璃匀浆器中，于冰上充分研磨或匀浆机研磨。为了进一步裂解组织细胞，可以对匀浆液进行超声破碎，或反复冻融。最后将匀浆液于 $5000 \times g$ 离心5-10分钟，取上清检测。

细胞裂解液：贴壁细胞用预冷PBS轻轻清洗，然后用胰蛋白酶消化， $1000 \times g$ 离心5分钟后收集细胞；悬浮细胞可直接离心收集。收集的细胞用预冷PBS清洗3次，每 1×10^6 个细胞中加入150-200 μL 的PBS重悬（推荐在PBS中加入蛋白酶抑制剂；若含量很低可

适当减少PBS体积) 并通过反复冻融或超声使细胞破碎。将提取液于2-8℃, 1500×g离心10分钟, 取上清检测。

其它样本类型: 1000×g离心20分钟, 取上清即可检测。

样品外观: 样品应清澈透明, 悬浮物应离心去除。

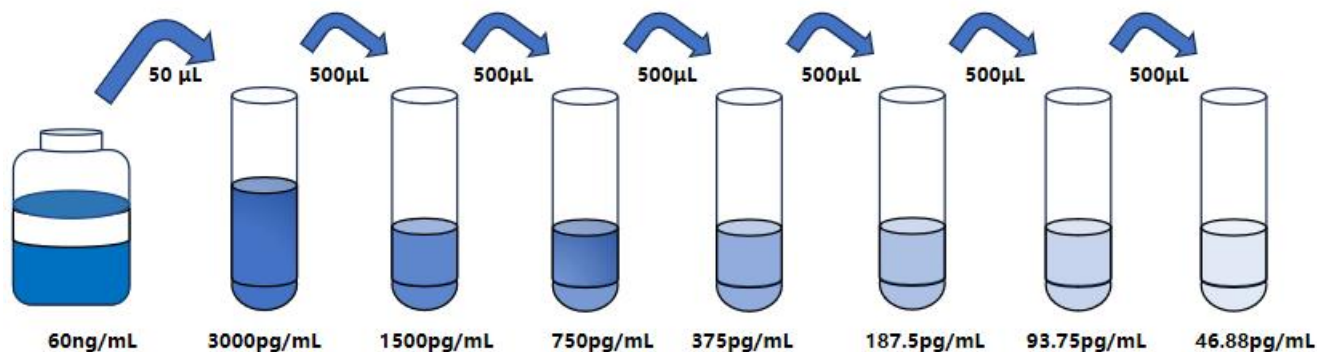
样品保存: 样品收集后若在 1 周内进行检测的可保存于4℃, 若不能及时检测, 请按一次使用量分装, 冻存于-20℃ (1个月内检测), 或-80℃ (6个月内检测), 避免反复冻融, 标本溶血会影响最后检测结果, 因此溶血标本不宜进行此项检测。

试剂准备工作

使用前将所有试剂置于室温平衡30分钟左右。

洗涤液/稀释液配置: 如果洗涤液/稀释液 (20×) 有晶体析出, 需在37℃下加热至晶体全部溶解。用蒸馏水1:20稀释 (例如: 1mL 浓缩洗涤液加入19mL的蒸馏水)

标准品配置: 试剂盒中取出标准品, 准备7个试管, 先从60ng/mL标准品 (200uL) 按需吸取一定量用1×稀释液稀释至3000pg/mL (例: 50uL的标准品母液+950uL的1×稀释液, 制备得到1000μL的3000pg/mL浓度标准品), 随后在6个试管中分别加入500 μL的1×稀释液, 在这6个单独的试管中将3000pg/mL标准品依次2倍倍比稀释至6个梯度, 共配制7个浓度的标准品, 依次为: 3000pg/mL、1500pg/mL、750pg/mL、375pg/mL、187.5pg/mL、93.75pg/mL、46.88pg/mL, 从最高浓度标准品溶液中吸取500μL标准品到下一个试管中, 轻轻吹打混匀, 以此类推进行标准品的倍比稀释 (如图所示), 1×稀释液用作零浓度标准品(0pg/mL)。



抗体工作液配置: 使用前10分钟, 将100×生物素化抗体于1000×g离心1分钟, 随后用1×稀释液将100×生物素化抗体稀释成1×生物素化抗体工作液, 根据所需用量当日配置当日使用。

酶结合物工作液配置: 使用前10分钟, 将100×SA-HRP溶液于1000×g离心1分钟, 随后用1×稀释液将100×SA-HRP稀释成1×SA-HRP工作液, 根据所需用量配置。

备注: 如待测样本中TREM2浓度高于标准品最高值, 请根据实际情况选择适当的稀释倍数。

实验步骤

所有标准品、样品建议复孔检测

1. 从室温平衡 60min 后的铝箔袋中取出所需板条, 剩余板条用自封袋密封放回 4℃。
2. 设置标准品孔和样本孔, 标准品孔各加不同浓度的标准品 50μL。
3. 样本孔中加入待测样本 50μL; 空白孔不加。样本不足, 或者样本浓度过高, 可用样本稀释液做稀释。
4. 除空白孔外, 标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的检测抗体 100μL, 用封板膜封住反应孔, 37℃水浴锅或恒温箱温育 60min。
5. 弃去液体, 吸水纸上拍干, 每孔加满洗涤液 (350μL), 静置 1min, 甩去洗涤液, 吸水纸上拍干, 如此重复洗板 5 次 (也可用洗板机洗板)。
6. 每孔加入底物 A、B 各 50μL, 37℃避光孵育 15min。
7. 每孔加入终止液 50μL, 15min 内, 在 450nm 波长处测定各孔的 OD 值。

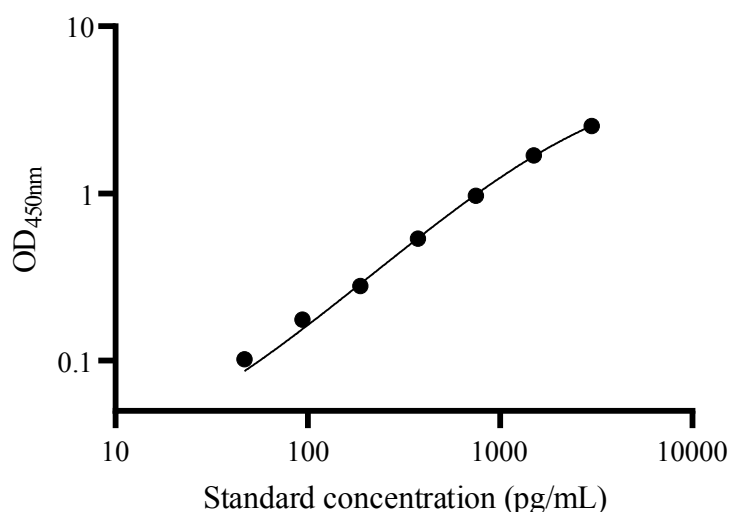
结果的计算

绘制标准曲线: 以所测标准品的 OD 值为横坐标, 标准品的浓度值为纵坐标, 在坐标纸上或用相关软件绘制标准曲线, 并得到直线回归方程, 将样品的 OD 值代入方程, 计算出样品的浓度。

示例数据

以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验数据建立标准曲线。

标准品浓度 (pg/mL)	3000	1500	750	375	187.5	93.75	46.88	0
OD 值	2.607	1.758	1.042	0.608	0.35	0.247	0.173	0.071
校正 OD 值	2.536	1.687	0.971	0.537	0.279	0.176	0.102	0



本图所示标准曲线仅供示例，结果计算应以同次试验标准品所绘标准曲线为准计算样本结果。

重复性

板内变异系数小于 10% ，板间变异系数小于 15% 。

灵敏度

本测试，本试剂盒的最低检测浓度小于7.81 pg/mL。

特异性

不与其它可溶性结构类似物交叉反应。

ELISA Plate Template											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11 12
A											
B											
C											
D											
E											
F											
G											
H											

生产企业: 重庆博纳创源生物科技有限公司

技术支持: 13251494839

技术邮箱: support_bionow@163.com