EliKine™ 大鼠自噬微管相关蛋白轻链3 (LC3) ELISA定量试剂盒（一步法）

Cat #: KTE4028 Size: 48 T/96 T

	大鼠自噬微管相关蛋白轻链 3 (LC3) ELISA 定量试剂盒（一步法）		
REF	**货号：**KTE4028	LOT	**批号：**见产品标签
	检测范围：15 pg/mL-1,200 pg/mL		**灵敏度：**3 pg/mL
	精密度：板内变异系数<10%, 板间变异系数<10%		**回收率：**范围从 98%到 116%，平均回收率 106%
	特异性：检测具有高灵敏度和优良的特异性。未观察到和大鼠自噬微管相关蛋白轻链 3（LC3）类似物之间的显着交叉反应或干扰。		
	适用样本：血清、血浆、组织、细胞上清及相关液体样本		
	保质期：4℃，避光保存 6 个月		

原理

EliKine™ 大鼠自噬微管相关蛋白轻链 3 (LC3) ELISA 定量试剂盒（一步法）采用双抗体夹心法测定标本中大鼠自噬微管相关蛋白轻链 3（LC3）水平。用抗大鼠自噬微管相关蛋白轻链 3（LC3）的特异性抗体包被于酶标板上，将样品或标准品加入酶标板的孔中，然后依次加入生物化的检测抗体和链霉亲和素-HRP，形成抗体-抗原-抗体-酶复合物，经过彻底洗涤后加入显色底物（TMB），TMB 在 HRP 催化下呈现蓝色，加终止液后变成黄色。用酶标仪在 450 nm 波长处测 OD 值，大鼠自噬微管相关蛋白轻链 3（LC3）浓度与 OD450 值之间呈正比。

包装清单

试剂盒组分	规格		储存条件
	48 T	96 T	
Rat LC3 Microplate	48 wells	96 wells	4℃
Rat LC3 Standard (2,400 pg/mL)	0.6 mL	0.6 mL	4℃
Standard Diluent	2 mL	2 mL	4℃
Rat LC3 Detect Antibody	0.7 mL	1.5 mL	4℃
Streptavidin-HRP	3 mL	6 mL	4℃
HRP Substrate A	3 mL	6 mL	4℃，避光保存
HRP Substrate B	3 mL	6 mL	4℃，避光保存
Stop Solution	3 mL	6 mL	4℃

Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.

Wash Buffer	20 mL (20×)	20 mL (30×)	4℃
Plate Covers	2	2	室温

自备耗材

- 酶标仪（能测 450 nm 处的吸光度）
- 多通道移液器或自动洗板机
- 恒温箱、低温离心机
- 可调节式移液枪及枪头
- 去离子水、PBS

试剂准备

Standard Diluent：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。Standard Diluent 用于稀释标准品。
Rat LC3 Standard: 即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。
Rat LC3 Detect Antibody：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。
Streptavidin-HRP：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。
HRP Substrate A：即用型；使用前，平衡到室温；4℃避光保存。
HRP Substrate B：即用型；使用前，平衡到室温；4℃避光保存。
Stop Solution：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。
1×Wash Buffer: Wash Buffer 使用前平衡到室温，48 T 用去离子水将 Wash Buffer 稀释 20 倍，96 T 用去离子水将 Wash Buffer 稀释 30 倍得到 1×Wash buffer。 轻轻混合以避免起泡，室温保存，此溶液可稳定保存 30 天。
标准曲线设置：按下表所示，用 Standard Diluent 将 2,400 pg/mL 标准品稀释为 1,200、600、300、150、75 和 0 pg/mL 的 Rat LC3 标准品。

序号	标准品体积	Standard Diluent 体积（μL）	标准品浓度（pg/mL）
Std.1	150 μL of 2,400 pg/mL	150	1,200
Std.2	150 μL of Std.1 (1,200 pg/mL)	150	600
Std.3	150 μL of Std.2 (600 pg/mL)	150	300
Std.4	150 μL of Std.3 (300 pg/mL)	150	150
Std.5	150 μL of Std.4 (150 pg/mL)	150	75
Std.6	0	150	0

注意：每次实验都需要新配制标准品。

样本制备

1. 细胞培养上清：离心除去颗粒，立即测定或分装-20℃保存，避免反复冻融。
2. 血清：使用血清分离管，让样品在室温下凝结 30 min，然后 1,000 g 离心 15 min。 取上层血清立即测定或分装-20℃保存，避免反复冻融。
3. 血浆：使用 EDTA、肝素或柠檬酸盐作为抗凝剂收集血浆。在收集后 30 min 内 1,000 g 离心 15 min。立即测定或分装-20℃保存，避免反复冻融。
4. 组织：称取 0.1 g 组织，加入 0.9 mL 冰预冷的 0.01M pH7.4 的 PBS（可加入蛋白酶抑制剂）冰浴匀浆，收集匀浆液 4℃，10,000 g 离心 10 min，取上清立即测定或分装-20℃保存，避免反复冻融。
5. 细胞：贴壁细胞用冷的 PBS 轻轻清洗，然后用胰蛋白酶消化，1,000 g 离心 5min 后收集细胞；悬浮细胞可直接离心收集。收集的细胞用冷的 PBS 洗涤 3 次。每 10^6 个细胞中加入个细胞中加入 150-200 μL PBS 重悬（推荐在 PBS 中加入蛋白酶抑制剂；若含量很低可减少 PBS 的体积）并通过冰浴超声破碎 2 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 12 次）。将提取液于 4℃，

Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.

10,000 g 离心 10min，取上清立即测定或者分装-20℃保存，避免反复冻融。

6. 尿液、唾液等其他液体生物样本：3,000 g 离心 10min，取上清立即测定或者分装-20℃保存，避免反复冻融。

注意：不要使用严重溶血或脂血的标本。如果样品要在 24 h 内使用，则可以将其储存在 2 至 8℃，避免反复冻融。测定前，应将冷冻样品缓慢升至室温并轻轻混合。

实验步骤

1. 从板框上取下多余的板条，将它们放回装有干燥剂包的铝箔袋中，然后重新密封。
2. 加样：分别设空白孔（空白对照孔不加样品、Rat LC3 Detect Antibody 及 Streptavidin-HRP，其余各步操作相同）、待测样品孔。在酶标包被板上待测样品孔中先加入 40 μL 样品，然后再加入 10 μL Rat LC3 Detect Antibody。加样将样品加于酶标板孔底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀。标准孔依次加入 50 μL 不同浓度的标准品。（注意：标准品中已经预加 Rat LC3 Detect Antibody，无需再加。）
3. 加 HRP：每孔加入 50 μL Streptavidin-HRP，空白孔除外，给酶标板覆膜，在 37℃下孵育 30 min。
4. 除去每孔中的液体并洗涤。可使用多通道移液器或自动清洗机每孔加入 300 μL 1×Wash buffer 静置浸泡 30 s，进行洗涤，重复 5 次。在每个步骤中完全去除液体对于获得良好性能至关重要。最后一次洗涤后，倒置酶标板并用干净的纸巾吸干以除去任何剩余的 1×Wash buffer。洗板完成之后，请立即使用微孔板，不要让微孔板干燥。
5. 每孔先加入 50 μL HRP Substrate A，再加入 50 μL HRP Substrate B，轻轻震荡混匀，37℃避光显色 10 min。
6. 每孔加入 50 μL Stop Solution，Stop Solution 应按照与 HRP Substrate 相同的顺序加到板中。孔中的颜色应从蓝色变为黄色。如果孔中的颜色为绿色或颜色变化不均匀，请轻轻敲击板以确保彻底混合。
7. 在 15 min 内，测定每孔 450 nm 处的吸光值。

结果计算

1. 计算每个标准品和样品的复孔平均 OD 值，并减去空白孔平均 OD 值。
2. 标准曲线的绘制：以标准品浓度为 x 轴，各标准品的平均ΔOD 值为 y 轴，绘制标准曲线。可以使用作图软件来创建标准曲线。将样品的ΔOD 值代入曲线方程式，计算得出样品的浓度。

注意：如果样品被稀释，从标准曲线读取的浓度必须乘以稀释系数。

结果展示

典型标准曲线（$R^2 \geqslant 0.99$）

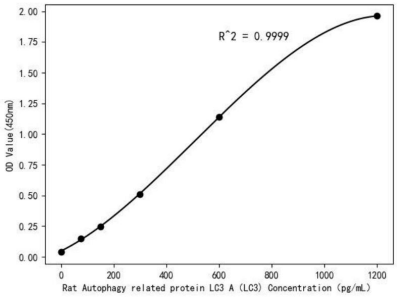


Figure1. 96 孔板分析的 Rat LC3 标准曲线。数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线

注意事项

1. 如果 Standard Diluent 出现颜色变黄，少量沉淀等现象，是因为试剂中含有血清导致，离心去掉沉淀即可，不影响正常使用。
2. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
3. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。
4. 为确保准确的结果，在孵育步骤中必须正确粘附板贴。
5. Stop Solution 有一定的腐蚀性，操作时请做好防护措施。

Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.

常见问题

问题	原因	解决建议
标准曲线无线性	加样不准	检查移液器
	稀释不当	开管前轻柔搅拌和旋转标准品保存管使粉末完全溶解
信号过低	样本孵育时间过短	确保足够的孵育时间；标准/样品孵育时间增加到 2 或 3 小时
	试剂体积不足或稀释不当	检查移液器并确保准备充分
	TMB 孵育时间过短	加 Stop Solution 之前，确保有足够的孵育时间，直到出现蓝色
高背景/CV 值过高	洗板不充分	仔细检查清洗步骤. 如果使用洗板机，检查所有接口
	Wash Buffer 被污染	准备新鲜的 Wash Buffer
低灵敏度	试剂盒保存不当	HRP Substrate A 和 HRP Substrate B 注意避光保存, 避免冷冻。
	终止问题	测量读数前需在所有孔中加入 Stop Solution 终止
稀释液沉淀	稀释液中有沉淀或凝结	稀释液缓慢加热至 37℃，沉淀可以复溶

免责声明

本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.