

Human TLR2 ELISA 试剂盒

产品编号# CHE0188 (48/96 孔)

适用于人血清、血浆或细胞培养上清液等样本

仅供研究，不用于临床诊断。



客服热线: 400-7060-959 * 技术支持邮箱: tech@4abio.com
公司官网: www.4abio.net

目录

| | |
|-------------------|--------|
| 简介 | - 3 - |
| 检测原理 | - 3 - |
| 试剂盒组分 | - 4 - |
| 储存条件 | - 4 - |
| 其他实验材料 | - 5 - |
| 注意事项 | - 5 - |
| 样本收集处理及保存方法 | - 5 - |
| 试剂准备 | - 6 - |
| 操作步骤 | - 7 - |
| 操作流程图 | - 8 - |
| 操作要点提示 | - 8 - |
| 结果判断 | - 8 - |
| 结果重复性 | - 9 - |
| 灵敏度 | - 9 - |
| 特异性 | - 10 - |
| 参考文献 | - 10 - |

 该产品由北京四正柏生物科技有限公司研制。

 请根据试剂盒中所附说明书指引进行实验。

简介

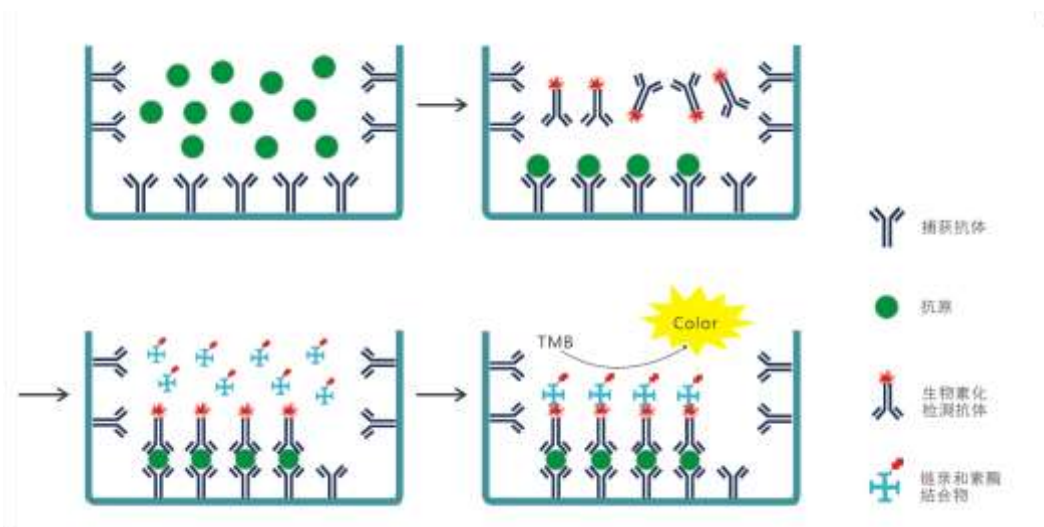
Toll 样受体(Toll- like receptors, TLR) 可以通过识别病原相关分子模式(pathogen- associated molecular patterns, PAMP)或有害的内源性物质诱发天然免疫反应, 抵抗病原体感染或组织损伤。TLR 家族的 TLR2、TLR4 的激活可诱导很强的免疫反应, 在天然免疫和炎症反应中起重要作用, 是连接天然免疫和获得性免疫的关键分子。但是过度的免疫反应也会带来不利影响。已有不少研究表明, 多种自身免疫性疾病、慢性炎症和感染性疾病都与 TLR2、TLR4 激活引发的免疫过度有密切联系, 尤其是心血管疾病等。

TLR2 位于细胞表面, 属 I 型跨膜蛋白, 包括富含亮氨酸重复序列的膜外区(识别并结合 PAMP)、跨膜区和含有 Toll/白细胞介素 1 受体同源区(Toll/IL- 1 receptor homologous region, TIR) 结构域的胞质区(介导下游信号传递)。TLR2 具有相对较广的配体特异性, 包括细菌来源的外源性配体和宿主来源的内源性配体。它能特异性识别革兰氏阳性菌成分, 包括脂磷壁酸(lipoteichoic acid, LTA) 。

在 TLR2、TLR4 信号通路中, 胞外 PAMP 或有害的内源性物质被 TLR2 或 TLR4 膜外区识别, 激活 TLR2 或 TLR4。其中, 髓样分化因子 88(myeloid differentiation factor88, MyD88) 依赖性途径是除 TLR3 以外其他所有 TLR 的共同信号通路。

检测原理

本实验采用双抗体夹心 ELISA。用抗人 TLR2 单克隆抗体预包被酶标板, 加入适度稀释的样本和标准品, 其中的 TLR2 会与其单抗结合, 洗去游离成分; 加入生物素化的抗人 TLR2 抗体, 抗人 TLR2 抗体与结合在单抗上的人 TLR2 结合而形成免疫复合物, 洗去游离的成分; 加入辣根过氧化物酶标记的亲合素, 生物素与亲合素特异性结合, 洗去未结合的酶结合物; 加入显色剂, 若反应孔中有 TLR2, 辣根过氧化物酶会使无色的显色剂现蓝色; 加终止液变黄。在 450nm 下测 OD 值, TLR2 浓度与 OD450 值之间呈正比, 可通过绘制标准曲线计算出标本中 TLR2 浓度。



检测原理示意图

试剂盒组分

| 试剂盒组分 | 96 孔 | 48 孔 | 配制 |
|---------------|------|------|-----------|
| 1a 标准品 | 2 支 | 1 支 | 按说明书进行稀释 |
| 1b 标准品和标本稀释液 | 1 瓶 | 1 瓶 | 即用型 |
| 2a 浓缩生物素化抗体 | 2 支 | 1 支 | 按瓶签标识进行稀释 |
| 2b 生物素化抗体稀释液 | 1 瓶 | 1 瓶 | 即用型 |
| 3a 浓缩酶结合物（避光） | 2 支 | 1 支 | 按瓶签标识进行稀释 |
| 3b 酶结合物稀释液 | 1 瓶 | 1 瓶 | 即用型 |
| 4 浓缩洗涤液 20× | 1 瓶 | 1 瓶 | 按瓶签标识进行稀释 |
| 显色剂（避光） | 1 瓶 | 1 瓶 | 即用型 |
| 终止液 | 1 瓶 | 1 瓶 | 即用型 |
| 抗体包被板条 | 8×12 | 8×6 | 即用型 |
| 封板胶纸 | 4 张 | 2 张 | 即用型 |
| 说明书 | 1 份 | 1 份 | |

如果您收到试剂盒后发现上表中有任何组分破损或缺失,请及时联系我司客服 400-7060-959 或 tech@4abio.com。我们将及时为您解答相关问题。

储存条件

| 未启封的试剂盒 | 4℃保存，请于保质期内使用。 | |
|-------------|------------------------------|--|
| 已启封或重新溶解的试剂 | 1b 标准品和标本稀释液 | |
| | 2a 浓缩生物素化抗体（100×） | |
| | 2b 生物素化抗体稀释液 | |
| | 3a 浓缩酶结合物（避光 100×） | |
| | 3b 酶结合物稀释液 | |
| | 4 浓缩洗涤液 20× | |
| | 显色剂（避光） | |
| | 终止液 | 4℃或常温保存 |
| | 标准品 | 重溶后分装，-20℃存放一个月，避免反复冻融。稀释后的标准品使用后应丢弃，不得重复使用。 |
| 抗体包被板条 | 实验中不用的板条应立即放回包装袋中，密封干燥 4℃保存。 | |

以上储存条件均要求在试剂盒保质期内。

其他实验材料 (不提供, 但可协助购买):

1. 酶标仪(450nm)
2. 高精度可调移液器及吸头: 0.5-10, 2-20, 20-200, 200-1000 μ l; 一次检测样品较多时, 最好用多通道移液器。
3. 自动洗板机或洗瓶
4. 37 $^{\circ}$ C温箱
5. 双蒸水或去离子水
6. 坐标纸
7. 量筒

注意事项

1. 试剂盒保存在2-8 $^{\circ}$ C, 除复溶后的标准品, 其它成分不可冷冻。
2. 浓缩生物素化抗体(2a)、浓缩酶结合物(3a)装量极少, 运输中颠簸和可能的倒置会使液体沾到管壁或瓶盖。使用前请离心处理以使附着于管壁或瓶盖的液体沉积到管底。
3. 为避免交叉污染请使用一次性吸头。
4. 终止液和显色剂具腐蚀性, 避免皮肤及粘膜直接接触, 一旦接触到这些液体, 请尽快用大量水冲洗。
5. 使用干净的塑料容器配制洗涤液, 使用前充分混匀试剂盒里的各种成份及样品。
6. 洗涤酶标板时应充分拍干, 不要将吸水纸直接放入酶标反应孔中吸水。
7. 不要用其它来源的试剂混合或替代该产品的组分, 不同批号的试剂盒组份不能混用, 请在有效日期内使用本产品。
8. 在试验中标准品和样本检测时建议作双复孔或三复孔, 加入试剂的顺序应一致, 以保证所有反应孔孵育的时间一样。
9. 充分混匀对反应结果尤为重要, 最好使用微量振荡器(使用最低频率进行振荡)。
10. 避免操作过程中酶标板干燥, 干燥会使酶标板上生物成分迅速失活, 影响实验结果。
11. 适当的稀释样品, 使样品值落在标准曲线范围内, 根据待测因子含量高、中、低的不同, 建议采用1:100, 1:10, 1:2稀释样品。如果样品OD值高于最高标准, 适当增加稀释度并重复检测。
12. 标准品稀释液、操作人、移液方式、洗涤方法、孵育时间及温度、试剂盒批次的不同均可能会导致结果的差异。
13. 此法可有效的消除可溶性受体、结合蛋白以及生物样品中的其他因素的干扰。

样本收集处理及保存方法

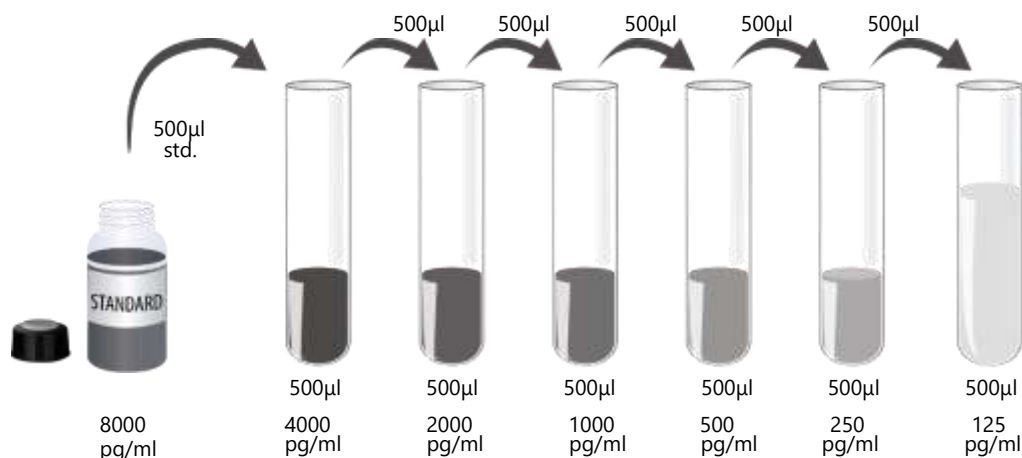
1. **血清**: 使用不含热原和内毒素的试管, 收集血液后, 室温凝血30min, 1000 \times g离心10min, 小心分离血清。
2. **血浆**: 用EDTA、柠檬酸盐、肝素作为抗凝剂收集血浆, 收集后30min内以1000 \times g离心15min去除颗粒。
3. **细胞上清液**: 1000 \times g离心10min去除颗粒和聚合物。

- 保存:** 若样品不立即检测, 请将其按一次用量分装, -20°C - 70°C 保存, 避免反复冻融。尽量避免使用溶血或高血脂样本。如果血清中含有大量颗粒, 检测前先离心或过滤去除; 室温下解冻, 请勿于 37°C 或更高的温度加热解冻。
- 稀释:** 可根据实际情况, 将标本做适当倍数稀释(建议做预实验, 以确定稀释倍数)。
注: 正常人血清或血浆样本建议做1:2稀释。

试剂准备

- 提前30min从冰箱中取出试剂盒, 平衡至室温。
- 洗涤缓冲液:** 从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶, 这属于正常现象, 加热并轻轻摇晃使结晶完全溶解后再配制。将浓缩洗涤液用双蒸水稀释(1:20)。未用完的放回 4°C 。
- 标准品:** 加入标准品/标本稀释液(1b)1.0ml至冻干标准品(1a)中, 待彻底溶解后, 静置15分钟混匀(浓度为 8000pg/ml), 然后根据需要进行稀释, 见下图(建议标准曲线使用以下浓度: 8000 、 4000 、 2000 、 1000 、 500 、 250 、 125 、 0pg/ml)。稀释的标准品不得重复使用, 未用完的标准品应按照一次用量分装后, 将其放在 $-20\sim-70^{\circ}\text{C}$ 贮存, 一次性使用, 避免反复冻融。

标准品稀释方法:



- 生物素化抗体工作液:** 根据每孔需要 $100\mu\text{l}$ 来计算总的用量, 多配制 $100\sim 200\mu\text{l}$ 。以生物素化抗体稀释液(2b)稀释浓缩生物素化抗体(2a)(1:100)。最好现用现配。(稀释方法参照下表)

| 所用板条数 | 浓缩生物素化抗体 | | 生物素化抗体稀释液 |
|-------|------------------|---|--------------------|
| 12 | $110\mu\text{L}$ | + | $10890\mu\text{L}$ |
| 10 | $90\mu\text{L}$ | + | $8910\mu\text{L}$ |
| 8 | $70\mu\text{L}$ | + | $6930\mu\text{L}$ |
| 6 | $50\mu\text{L}$ | + | $4950\mu\text{L}$ |
| 4 | $33\mu\text{L}$ | + | $3267\mu\text{L}$ |
| 2 | $17\mu\text{L}$ | + | $1683\mu\text{L}$ |
| 1 | $9\mu\text{L}$ | + | $891\mu\text{L}$ |

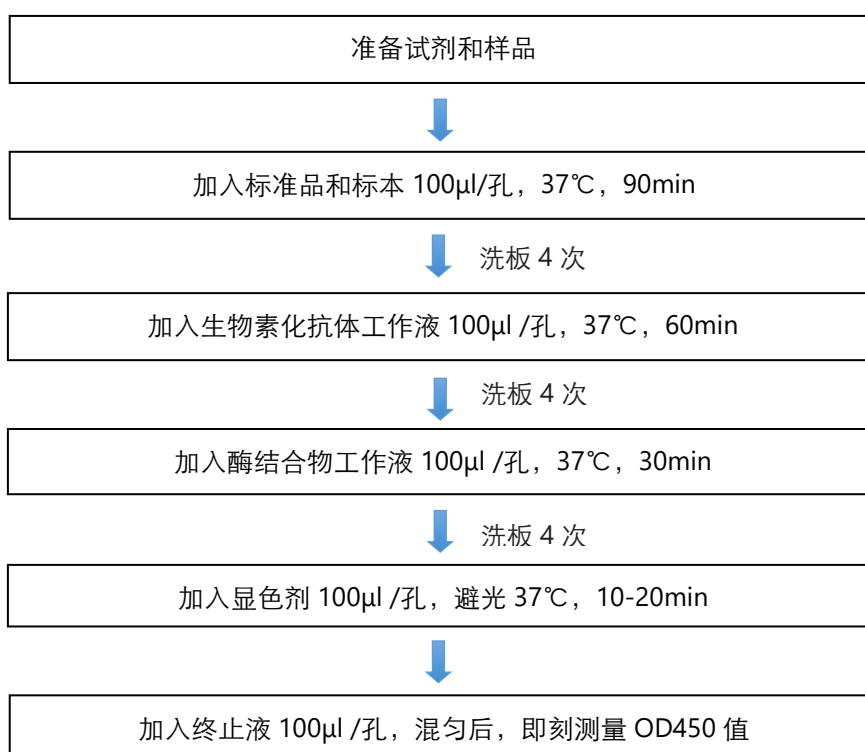
5. **酶结合物工作液**：以酶结合物稀释液(3b) 稀释浓缩酶结合物(3a)(1:100)。最好现用现配。
(稀释方法参照下表)

| 所用板条数 | 浓缩酶结合物 | | 酶结合物稀释液 |
|-------|-------------|---|---------------|
| 12 | 110 μ L | + | 10890 μ L |
| 10 | 90 μ L | + | 8910 μ L |
| 8 | 70 μ L | + | 6930 μ L |
| 6 | 50 μ L | + | 4950 μ L |
| 4 | 33 μ L | + | 3267 μ L |
| 2 | 17 μ L | + | 1683 μ L |
| 1 | 9 μ L | + | 891 μ L |

操作步骤

- 按照上述准备工作配制好各种溶液。
- 根据待测样品数量和标准品的数量决定所需的板条数，并增加1孔作为空白对照孔。分别将标本和不同浓度标准品(100 μ l /孔)加入相应孔中（零孔只加标准品/样本稀释液），用封板胶纸封住反应孔，37 $^{\circ}$ C孵箱孵育90分钟（空白对照孔除外）。
- 洗板4次：(1)自动洗板机：要求注入的洗涤液为350 μ l，注入与吸出间隔15-30秒。(2)手工洗板：甩尽孔内液体，每孔加洗涤液350 μ l，静置30秒后甩尽液体，在厚透吸水纸上拍干。
- 加入生物素化抗体工作液(100 μ l /孔)。用封板胶纸封住反应孔，37 $^{\circ}$ C孵箱孵育60分钟(空白对照孔除外)。
- 洗板4次。
- 加入酶结合物工作液(100 μ l /孔)。用封板胶纸封住反应孔，37 $^{\circ}$ C孵箱孵育30分钟（空白对照孔除外）。
- 洗板4次。
- 加入显色剂100 μ l /孔，避光，37 $^{\circ}$ C孵箱孵育10-20分钟。
- 加入终止液100 μ l /孔，混匀后即刻测量OD450值(5分钟内)。

操作流程图



操作要点提示

1. 配制各种试剂时要充分混匀，但要避免产生大量泡沫，以免加样时加入大量的气泡，产生加样误差。
2. 为避免交叉污染，在加入不同浓度的标准品、不同样品、不同试剂时谨记及时更换吸头。
3. 为了确保准确的结果，在每次孵育前均需使用新封板胶纸封住反应孔。
4. 显色剂在添加之前，应保持无色，请勿使用已变为蓝色的显色溶液。最佳显色时间对标准曲线很重要，肉眼可见前 3-4 孔有梯度蓝色，后 3-4 孔差别不明显，零孔无蓝色出现即可终止。
5. 每次检测均要做标准曲线，根据样品待测因子的含量，适当稀释或浓缩样本，最好做预实验。

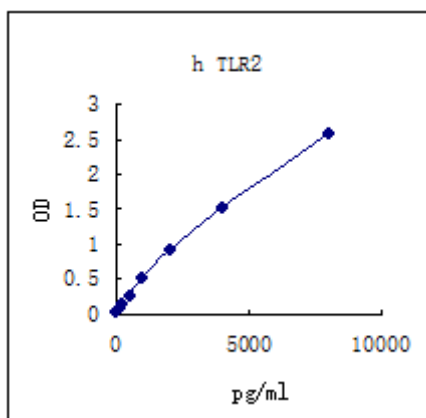
结果判断

1. 每个标准品和标本的OD值应减去空白孔的OD值，如果做复孔，求其平均值。
2. 使用计算机软件以吸光度OD值为纵坐标(Y)，相应的TLR2标准品浓度为横坐标(X)，生成相应的标准曲线，样品的TLR2含量可根据其OD值由标准曲线换算出相应的浓度。

3. 若标本 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算标本含量。
4. 参考数据：

| 标准品浓度(pg/ml) | OD值1 | OD值2 | 平均值 | 矫正值 |
|--------------|-------|-------|-------|-------|
| 0 | 0.056 | 0.059 | 0.058 | — |
| 125 | 0.122 | 0.128 | 0.125 | 0.067 |
| 250 | 0.180 | 0.175 | 0.178 | 0.120 |
| 500 | 0.300 | 0.286 | 0.293 | 0.235 |
| 1000 | 0.539 | 0.547 | 0.543 | 0.485 |
| 2000 | 0.947 | 0.944 | 0.946 | 0.888 |
| 4000 | 1.543 | 1.526 | 1.535 | 1.477 |
| 8000 | 2.576 | 2.568 | 2.572 | 2.514 |

数据仅供参考，不同用户最佳显色时间会有所不同



本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线为准

结果重复性

板间，板内变异系数均<10%。

灵敏度

最低检测人 TLR2 剂量小于 60pg/ml。最低检出量测定方法：20 个零标准的平均 OD 值增加两个标准差，再计算相应的浓度。

特异性

此试剂盒可检测天然和重组的人TLR2，以50ng/ml平行做特异性试验，均不与下列细胞因子及蛋白反应。

| 重组人细胞因子 |
|---------|
| BMP-2 |
| BMP-3 |
| BMP-4 |
| BMP-5 |

参考文献

1. Anwar MA, Basith S, Choi S. Negative regulatory approaches to the attenuation of Toll- like receptor signaling [J/OA]. *Exp Mol Med*, 2013, 45: e11.
2. Lucas K, Maes M. Role of the toll like receptor (TLR) radical cycle in chronic inflammation: possible treatments targeting the TLR4 pathway [J]. *Mol Neurobiol*, 2013, 48(1) : 190 —204.
3. Moghimpour Bijani F, Vallejo JG, Rezaei N. Toll- like receptor signaling pathways in cardiovascular diseases: challenges and opportunities [J]. *Int Rev Immunol*, 2012, 31(5) : 379 —395.