版本号： Datasheet-KE00505-A.0

生效日期： 2025-02-27

人BCL9双抗夹心ELISA检测试剂盒

请在实验前仔细阅读本说明书

产品货号：	KE00505
规 格：	96T
灵敏度：	0.04 ng/mL
检测范围:	0.156-10 ng/mL
用 途：	此试剂盒用于定量检测细胞裂解液中的人BCL9浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

目录

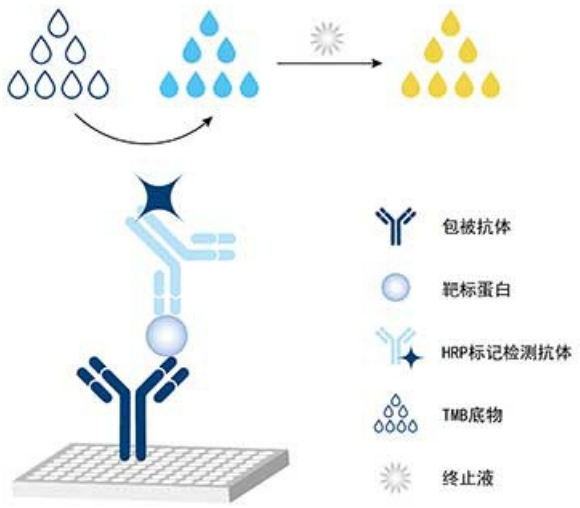
一：背景信息 3
二：检测原理 3
三：需自备的实验器材 3
四：试剂盒组分及储存 4
五：实验注意事项 4
六：样本准备 4
七：试剂准备 5
八：实验步骤 6
九：实验参数 7
9.1 参考标曲图 7
9.2 精密度 7
9.3 加标回收率 7
9.4 样本值 7
9.5 灵敏度 8
9.6 线性 8
9.7 特异性 8
十：参考文献 8

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

一：背景信息

BCL9是多种癌症类型的关键发育调节因子和公认的致癌驱动因子。BCL9在多种组织中表达，包括胸腺、脾脏、心脏、骨骼肌和肺。BCL9通过增强Wnt/β-catenin信号通路促进肿瘤进展和转移。它还在肿瘤免疫细胞浸润的调节中发挥作用，有助于免疫逃避。

二：检测原理



◀双抗夹心模式图 (检测抗体直标HRP)

按操作顺序形成抗体夹心结构后，加入TMB底物，板孔液体由无色变成蓝色，再加入终止液液体变为黄色后进行吸光度值测定。

三：需自备的实验器材

3.1 酶标仪 (可读取450 nm和630 nm双波长)；

3.2 高精度移液器及一次性移液器枪头；

3.3 洗板机 (亦可手动洗板)；

3.4 EP管 (用于稀释标准品及样本)；

3.5 吸水毛巾或滤纸 (用于拍干)；

3.6 烧杯和量筒；

3.7 用于ELISA实验的数据分析的统计拟合软件 (推荐四参数拟合方法)，如：Origin，ELISA Calc等。

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

四：试剂盒组分及储存

英文名称	中文名称	规格	数量
Microplate	预包被酶标板 - 96 孔板	8孔 × 12条	1 块
Protein standard	标准品 - 冻干粉状 *	20 ng/瓶	2 瓶
Detection antibody, HRP-conjugated (100×)	HRP标记检测抗体浓缩液（100×） **	120 uL/管	1 管
Sample Diluent PT 4B1	样本稀释液 PT 4B1	30 mL/瓶	1 瓶
Detection Diluent	抗体稀释液	30 mL/瓶	1 瓶
Wash Buffer Concentrate (20×)	浓缩洗涤液 (20×)	30 mL/瓶	1 瓶
Extraction Reagent	裂解液	30 mL/瓶	1 瓶
Tetramethylbenzidine Substrate (TMB)	显色底物 TMB	12 mL/瓶	1 瓶
Stop Solution	终止液	12 mL/瓶	1 瓶
Plate Cover Seals	封板膜		4张
储存条件： 1：未开启试剂盒可在2-8°C条件下存放6个月或者在-20°C条件下存放1年 2：已开启试剂盒可在2-8°C存放7天 3：每次实验均使用新的标准品,使用后丢弃			

* 使用对应的样本稀释液对标准品进行复溶，复溶过程避免产生气泡
** 开盖前请离心

五：实验注意事项

5.1 避免皮肤接触终止液以及TMB 显色液；

5.2 在实验过程中，注意穿戴个人防护装备，如实验服，手套，口罩和护目镜；

5.3 请勿将不同批次的试剂进行混用，过期产品请勿使用；

5.4 在使用自动洗板机时，板孔加入洗涤液之后，设置30秒的浸泡程序，以提高分析的精确度。

六：样本准备

6.1 细胞裂解液：收集细胞后，用预冷(2-8°C)的1×PBS洗3次，500×g离心5 min。细胞计数，离心弃上清；加PMSF至细胞裂解液中，终浓度为1 mM；按每1×10^7个细胞，加入1 mL细胞裂解液(含PMSF)，冰上裂解30 min，其间上下颠倒使裂解更充分，超声波破碎处理，8000×g-10000×g离心5 min，分离上清，分装后-80°C存放，并用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定总蛋白浓度，避免反复冻融。

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

七：试剂准备

7.1 洗涤液（1×）：

如果洗涤液（20×）有晶体析出，37°C加热至晶体全部溶解。按1:20稀释倍数进行稀释：如取30 mL 浓缩洗涤液（20×），加入570 mL 超纯水或去离子水，得到洗涤液（1×）。

7.2 HRP标记检测抗体（1×）：

开盖前瞬时离心，按1:100比例进行稀释，稀释前根据预先计算实验所需的总量配制（100 uL/孔），实际配制时应多配制0.1-0.2 mL。如10 uL HRP标记检测抗体浓缩液（100×）加 990 uL **抗体稀释液**进行配制，轻轻混匀。

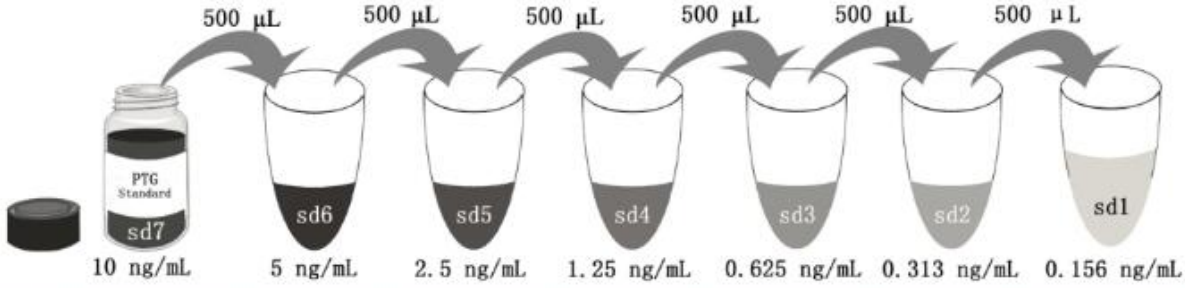
7.3 待检测样本：

不同的样本使用相应的样本稀释液进行稀释，如果样本检测值超过标曲最高范围，可将样本进行一定的稀释后再进行实验，使样本的检测值处于标曲范围内，不同样本的稀释倍数需自行优化。

稀释比推荐如下：细胞裂解液样本1:4或1:8稀释；样品采集、处理和储存的差异可能导致测值的改变。

7.4 梯度稀释的标准品：

用2 mL PT 4B1样本稀释液复溶标准品，具体操作如下：



Add # µL of Standard diluted in the previous step	—	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
# µL of Sample Diluent PT 4B1	**2000 µL**	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
	"sd7"	"sd6"	"sd5"	"sd4"	"sd3"	"sd2"	"sd1"

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

八：实验步骤

实验前，需要将所需试剂在室温平衡20-30min（HRP标记检测抗体浓缩液不需要平衡室温，即用即取）；在进行标准品、样本以及不同试剂加样时，更换枪头，避免接触微孔板的内表面，不同的试剂，使用不同的加样槽。

8.1 根据实验用量，取出需要用到的酶标板条，剩余板条加入干燥剂放入铝箔袋密封后存放于4°C，并于一周之内用完；

8.2 加样，分别设零孔、标准孔、待测样本孔。零孔加样本稀释液100 μL，余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本100 μL/孔，注意不要产生气泡（建议标准品和样本都做复孔，尽量避免实验误差，确保上样不间断，5-10 min完成加样）；

8.3 酶标板盖上覆膜，37°C孵育2 h；

8.4 洗涤

1） 揭开封板膜（动作轻柔，避免动作过大导致液体溢出串孔），弃液体，拍干；

2） 洗涤液（1×）洗涤板条，每孔350-400 μL，洗涤后，甩掉液体拍干板条，重复此步骤4次，避免异物进入板孔以及板条干燥；

8.5 每孔加100 μL HRP标记检测抗体（1×）(参照试剂准备部分7.2)，盖上封板膜，37°C孵育40 min；

8.6 重复步骤8.4；

8.7 显色：每孔加TMB显色液100 μL，37°C避光显色 15-20 min（如果颜色偏浅，可适当延长显色时间，不超过30 min；保持显色底物始终处于避光状态，显色底物在加样前应是无色透明，如有变色，请勿使用）；

8.8 终止：每孔加终止液100 μL，蓝色变黄色。终止液与TMB显色液的加样顺序一致；（注意：眼睛和皮肤避免接触终止液）

8.9 读数：以630 nm为校正波长，用酶标仪在450 nm波长测量各孔的光密度(OD值)。加入终止液后5 min内进行读数，若无630 nm波长，也可直接使用450 nm 波长读数；

8.10 数据分析: 每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD值为纵坐标，使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

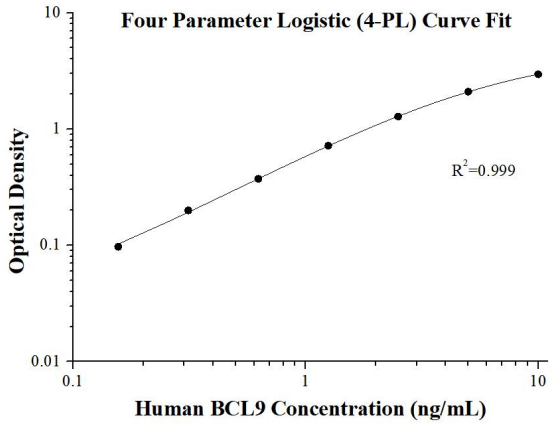
操作流程如下：

步骤	试剂	体积	孵育时间	洗涤次数	孵育温度
1	标准品或样本	100 μL	120 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
2	HRP标记检测抗体（1×）	100 μL	40 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
3	显色 TMB	100 μL	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37°C孵育，避光
4	终止液	100 μL	0 分钟	不需要洗涤	-
5	加入终止液后以630 nm为校正波长，在450 nm处测量OD值，此过程建议不超过5分钟				

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

九：实验参数

9.1 参考标曲图



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.0457 0.0424	0.04405	-
0.156	0.1424 0.1401	0.14125	0.0972
0.313	0.2459 0.241	0.24345	0.1994
0.625	0.4159 0.4179	0.4169	0.37285
1.25	0.7581 0.7671	0.7626	0.71855
2.5	1.3353 1.3132	1.32425	1.2802
5	2.1424 2.1325	2.13745	2.0934
10	3.05 2.9558	3.0029	2.95885

9.2 精密度

板内精密度: 3个不同浓度的样本在板内重复测定 8 次;

板间精密度: 3个不同浓度的样本在板间重复测定 16 次。

板内精密度 (CV内)				
样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%
1	8	4.74	0.37	7.73
2	8	1.20	0.07	5.79
3	8	0.66	0.05	7.81

板间精密度 (CV 间)				
样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%
1	16	4.82	0.44	9.22
2	16	1.19	0.09	7.24
3	16	0.69	0.06	8.68

9.3 加标回收率

样本稀释后，在标曲范围内选择高、中、低3个浓度，进行人BCL9的加标回收率实验，结果如下：

样本类型	稀释倍数	平均值 (%)	范围 (%)
细胞裂解液	1:32	93	91-97

9.4 样本值

细胞裂解液

	人 BCL9 (ng/mL)	总蛋白 (mg/mL)
COLO 320 细胞裂解液	33.47	1.40
HeLa 细胞裂解液	9.04	1.80

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

9.5 灵敏度

用20个重复的零孔平均OD值加上两倍标准差得到的OD值带入标准曲线拟合出对应的浓度值，此试剂盒中人BCL9的灵敏度为0.04 ng/mL。

9.6 线性

用对应样本稀释液稀释样本，使稀释后的检测值处于标曲范围内，线性数据如下：
（细胞裂解液样本预先稀释2倍。）

		细胞裂解液
1:2	均值 (%)	100
	范围 (%)	-
1:4	均值 (%)	101
	范围 (%)	94-108
1:8	均值 (%)	93
	范围 (%)	78-108
1:16	均值 (%)	100
	范围 (%)	88-111

9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人BCL9。

十：参考文献

1. Wu M, et al. (2023) Genes Dis, 11(2):701-710.
2. Zhang H, et al. (2021) Future Med Chem, 13(10):927-940.
3. Wang Z, et al. (2021) Med Res Rev, 41(4):2109-2129.

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com