



## 人CCL17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： KE00324

规 格： 96T

灵敏度： 2.8 pg/mL

检测范围： 7.8-500 pg/mL

用 途： 此试剂盒用于定量检测血清、血浆以及细胞上清中的人的CCL17浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

## 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 .....    | 8 |
| 9.5 灵敏度 .....    | 8 |
| 9.6 线性 .....     | 8 |
| 十：参考文献 .....     | 9 |

## 一：背景信息

趋化因子配体(CCL17)，也称为胸腺活化调节趋化因子(TARC)，是CC趋化因子家族的一员，在胸腺和其他细胞，如角质形成细胞、内皮细胞、树突状细胞、支气管上皮细胞和成纤维细胞中高表达。CCL17在胸腺T细胞的发育以及成熟T细胞的运输和激活中起着重要作用。CCL17特异地与T细胞结合，并通过与趋化因子受体CCR4结合展现其趋化作用。

## 二：检测原理



## 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。

## 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 *           | 1000 pg/瓶 | 2 瓶 |
| Detection antibody, HRP-conjugated (100×) | HRP标记检测抗体浓缩液 (100×) ** | 120 μL/支  | 1 支 |
| 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 |
| 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 血清：全血标本室温凝固 30 min后1000×g 离心15 min，取上清立即使用或分装后-20°C存放，避免反复冻融。
- 6.2 血浆: 可用EDTA、肝素或柠檬酸盐作为抗凝剂, 标本采集后1000×g 离心15 min, 立即使用或分装后-20°C存放, 避免反复冻融  
(注意：标本溶血会影响检测结果，因此溶血标本不宜进行检测)。
- 6.3 细胞上清: 收集细胞培养液, 500×g 离心5 min取上清，立即使用或分装后-20°C存放，避免反复冻融。

## 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 μL/孔），实际配制时应多配制0.1-0.2 mL。如10 μL HRP标记检测抗体浓缩液（100×）加990 μL 抗体稀释液进行配制，轻轻混匀。

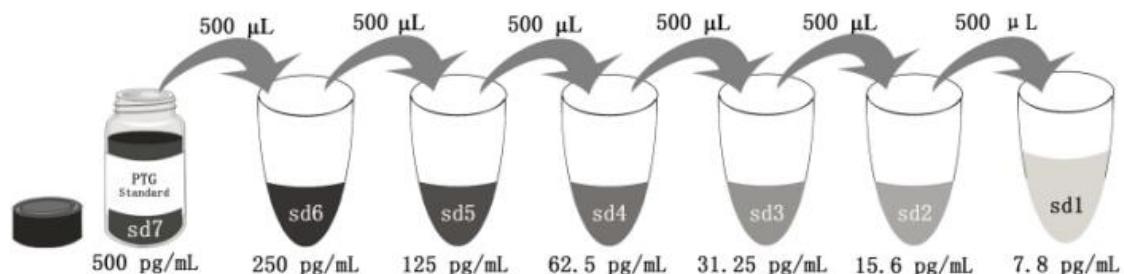
### 7.3 待检测样本：

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：人血清和血浆样本1:4或1:8稀释；细胞上清样本1:8或1:16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 |
|---|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| # μL of Sample Diluent PT 4B1                     | 2000 μL | 500 μL |
|   | "sd7"   | "sd6"  | "sd5"  | "sd4"  | "sd3"  | "sd2"  | "sd1"  |

## 八：实验步骤

实验前，需要将所需试剂在室温平衡20-30 min（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；

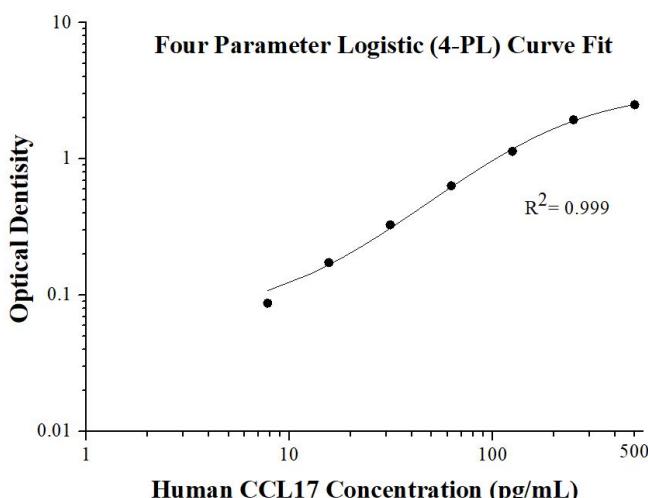
8.10 数据分析：每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD值为纵坐标，使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

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 |        |          |       |              |

## 九：实验参数

### 9.1 参考标曲图



|       | (pg/mL)          | O.D    | Average | Corrected |
|-------|------------------|--------|---------|-----------|
| 0     | 0.0234<br>0.0253 | 0.0244 | -       | -         |
| 7.8   | 0.1259<br>0.0982 | 0.1121 | 0.0877  |           |
| 15.6  | 0.1942<br>0.2026 | 0.1984 | 0.174   |           |
| 31.25 | 0.351<br>0.3566  | 0.3538 | 0.3294  |           |
| 62.5  | 0.6435<br>0.6792 | 0.6614 | 0.637   |           |
| 125   | 1.1328<br>1.1999 | 1.1664 | 1.142   |           |
| 250   | 1.9226<br>2.0059 | 1.9643 | 1.9399  |           |
| 500   | 2.5126<br>2.5503 | 2.5315 | 2.5071  |           |

### 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 20 次；

板间精密度: 3个不同浓度的样本在板间重复测定 24 次。

| 板内精密度 (CV内) |    |             |      |         |
|-------------|----|-------------|------|---------|
| 样本          | 数量 | 平均值 (pg/mL) | 标准差  | 变异系数CV% |
| 1           | 20 | 253.3       | 13.2 | 5.2     |
| 2           | 20 | 55.8        | 3.4  | 6.1     |
| 3           | 20 | 11.9        | 1.1  | 9.1     |

| 板间精密度 (CV 间) |    |             |     |         |
|--------------|----|-------------|-----|---------|
| 样本           | 数量 | 平均值 (pg/mL) | 标准差 | 变异系数CV% |
| 1            | 24 | 260.0       | 8.1 | 3.1     |
| 2            | 24 | 60.1        | 2.3 | 3.8     |
| 3            | 24 | 15.1        | 1.1 | 7.4     |

### 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CCL17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 (%)  |
|------|------|--------|---------|
| 人血浆  | 1:16 | 114    | 96-121  |
|      | 1:32 | 110    | 101-118 |
| 细胞上清 | 1:2  | 113    | 100-126 |
|      | 1:4  | 102    | 97-107  |

## 9.4 样本值

人血清/血浆 - 应用本试剂盒，检测人血清和血浆样本中的人CCL17的浓度。

| 样本类型       | 均值 (pg/mL) | 范围 (pg/mL)   |
|------------|------------|--------------|
| 人血清 (n=16) | 862.9      | 554.4-1285.3 |
| 人血浆 (n=16) | 539.7      | 104.5-1811.1 |

细胞上清 - 在含10%胎牛血清、50  $\mu$ M $\beta$ -巯基乙醇、2 mM L-谷氨酰胺、100 U/mL青霉素和100  $\mu$ g/mL硫酸链霉素的RPMI中培养人外周血单核细胞 ( $1 \times 10^6$  cells/mL)，细胞未经刺激或在10  $\mu$ g/mL PHA刺激下培养4天。收集细胞上清，并测定人CCL17的浓度。

| 刺激条件 | (pg/mL) |
|------|---------|
| 未刺激  | 261.4   |
| 刺激4天 | 2025.9  |

## 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CCL17的灵敏度为2.8 pg/mL。

## 9.6 线性

人血浆和细胞上清样本用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：

(人血浆样本预先稀释2倍。)

|      |        | 人血浆     | 细胞上清    |
|------|--------|---------|---------|
| 1:2  | 均值(%)  | 100     | 100     |
|      | 范围 (%) | -       | -       |
| 1:4  | 均值(%)  | 100     | 101     |
|      | 范围 (%) | 97-104  | 95-104  |
| 1:8  | 均值(%)  | 113     | 102     |
|      | 范围 (%) | 104-120 | 101-103 |
| 1:16 | 均值(%)  | 114     | 101     |
|      | 范围 (%) | 103-123 | 99-105  |

## 十：参考文献

1. Imai T. et al. (1996) J Biol Chem. 271:21514-1.
2. Sallusto F. et al. (1998) Eur J Immunol. 28:2760-9.
3. Campbell JJ. et al. (1999) Nature. 400:776-80.
4. Vestergaard C. et al. (1999) J Clin Invest. 104:1097-105.
5. Sekiya T. et al. (2000) J Immunol. 165:2205-13.
6. Yu B. et al. (2000) J Dermatol Sci. 30:29-36.