

## 人CD22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: KE01009  
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血清、血浆以及细胞裂解液中的人CD22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	8
9.4 样本值	8
9.5 灵敏度	8
9.6 线性	9
9.7 特异性	9
十：参考文献	9

## 一：背景信息

CD22也称为唾液酸结合Ig样凝集素2 (Siglec-2) 或B淋巴细胞粘附分子 (BL-CAM)，它是一种分子量为130-140 kDa的I型跨膜糖蛋白，属于免疫球蛋白超家族，特异性地表达于B细胞。CD22在原B细胞和前B细胞的胞质中低表达，在B细胞分化成熟阶段出现在细胞表面，在终末分化的浆细胞表面表达缺失。CD22是B细胞受体 (BCR) 信号转导的抑制性受体，它与 $\alpha$ -2, 6连接的唾液酸结合，介导B细胞间的相互作用。CD22在B细胞的激活和分化中起着至关重要的作用。CD22胞外段可发生断裂而形成可溶性CD22 (sCD22)。血清中sCD22可能作为毛细胞白血病的肿瘤标志物。

## 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。

## 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 μL/支	1 支
Sample Diluent PT 5-ef	样本稀释液 PT 5-ef (用于人血清和血浆样本)	30 mL/瓶	1 瓶
Sample Diluent PT 4B1	样本稀释液 PT 4B1 (用于细胞裂解液样本)	30 mL/瓶	2 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℃条件下存放6个月或者在-20℃条件下存放1年  
2：已开启试剂盒可在2-8℃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℃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℃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 细胞裂解液：收集细胞后，用预冷(2-8℃)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 $1 \times 10^7$ 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℃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。

## 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 990μL 抗体稀释液进行配制，轻轻混匀。

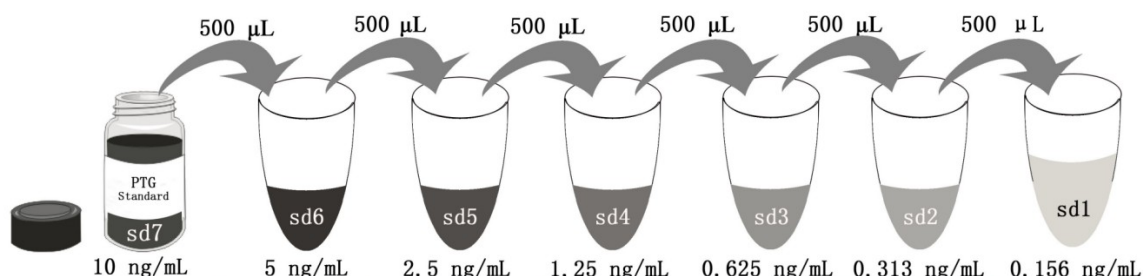
### 7.3 待检测样本：

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1:2稀释；细胞裂解液样本1:128或1:256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：

检测人血清和血浆样本，用2 mL PT 5-ef样本稀释液复溶标准品；检测细胞裂解液样本，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 5-ef or PT 4B1	<b>2000 μL</b>	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 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20-30min（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；

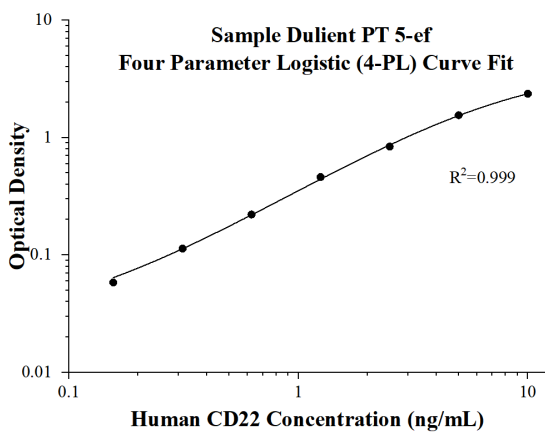
8.10 数据分析：每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD值为纵坐标，使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

操作流程如下：

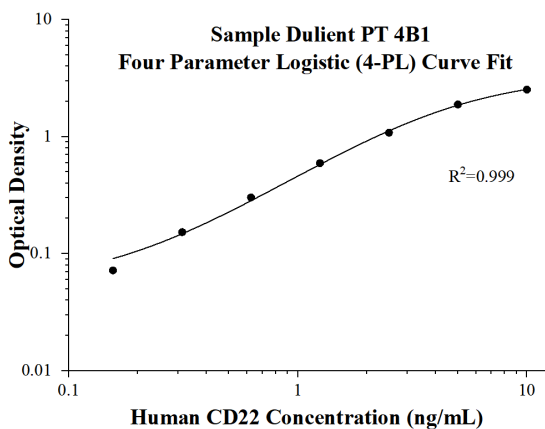
步骤	试剂	体积	孵育时间	洗涤次数	孵育温度
1	标准品或样本	100 μL	120 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
2	HRP标记检测抗体（1×）	100 μL	40 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
3	显色 TMB	100 μL	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37°C孵育，避光
4	终止液	100 μL	0 分钟	不需要洗涤	-
5	加入终止液后以630 nm为校正波长，在450 nm处测量OD值，此过程建议不超过5分钟				

## 九：实验参数

### 9.1 参考标曲图



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.0221 0.0251	0.0236	-
0.156	0.0789 0.0849	0.0819	0.0583
0.313	0.1328 0.1412	0.137	0.1134
0.625	0.2383 0.2515	0.2449	0.2213
1.25	0.4732 0.4963	0.48475	0.46115
2.5	0.8206 0.9055	0.86305	0.83945
5	1.5001 1.6536	1.57685	1.55325
10	2.3857 2.3898	2.38775	2.36415



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.0168 0.0153	0.01605	-
0.156	0.0882 0.0878	0.088	0.07195
0.313	0.1641 0.1734	0.16875	0.1527
0.625	0.3192 0.3182	0.3187	0.30265
1.25	0.6097 0.6098	0.60975	0.5937
2.5	1.0975 1.0984	1.09795	1.0819
5	1.9094 1.8969	1.90315	1.8871
10	2.5427 2.5419	2.5423	2.52625

### 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	0.15	3.21
2	8	1.21	0.04	2.92
3	8	0.63	0.01	1.48

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	4.50	0.28	6.29
2	16	1.25	0.04	3.41
3	16	0.66	0.04	6.33

### 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CD22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	1:2	76	73-82
细胞裂解液	1:512	82	73-87

### 9.4 样本值

人血浆 - 应用本试剂盒，检测人血浆样本中人CD22的浓度。

样本类型	均值 (ng/mL)	检出率 (%)	范围 (ng/mL)
人血浆样本 (n=16)	0.47	81	ND-1.02

ND\*=Non-detectable

#### 细胞裂解液

	人CD22 (ng/mL)	总蛋白量 (mg/mL)
Raji细胞裂解液	388.92	1.80
Ramos细胞裂解液	302.17	2.30
Daudi细胞裂解液	403.95	1.10

### 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CD22的灵敏度为0.04 ng/mL。

## 9.6 线性

人血浆加入高浓度的人CD22蛋白，梯度稀释后检测样本加标线性，细胞裂解液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64倍。)

		人血浆 (样本稀释液 PT 5-ef)	细胞裂解液 (样本稀释液 PT 4B1)
1:2	均值 (%)	82	100
	范围 (%)	79-85	-
1:4	均值 (%)	89	106
	范围 (%)	87-90	103-110
1:8	均值 (%)	92	112
	范围 (%)	91-92	110-115
1:16	均值 (%)	102	114
	范围 (%)	100-103	111-119

## 9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人CD22，加入50 ng/mL以下细胞因子，无明显交叉反应。

Human:

Mouse:

CD45

CD22

Lyn

## 十：参考文献

1. Clark, E A. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) vol. 150,11 (1993): 4715-8.
2. Nitschke, L et al. Current biology : CB vol. 7,2 (1997): 133-43.
3. Carnahan, Josette et al. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research vol. 9,10 Pt 2 (2003): 3982S-90S.
4. Matsushita, Kakushi et al. Blood vol. 112,6 (2008): 2272-7.