

## 人CD30/TNFRSF8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: KE00514

规格: 96T

灵敏度: 2.4 pg/mL

检测范围: 15.6-1000 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CD30/TNFRSF8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 |
| 9.7 特异性    | 8 |
| 十：参考文献     | 9 |

## 一：背景信息

CD30，又称TNFRSF8或Ki-1，是一种属于肿瘤坏死因子受体超家族的跨膜糖蛋白。它由一个含有6个富含半胱氨酸重复序列的胞外结构域、一个跨膜段和一个胞内结构域组成。CD30表达于一小部分活化的T、B淋巴细胞，以及多种淋巴系肿瘤，在经典型霍奇金淋巴瘤和间变性大细胞淋巴瘤中表达最高。CD30配体（又称CD30L或CD153）是肿瘤坏死因子配体超家族的II型跨膜糖蛋白。CD30/CD30L利用TNFR相关因子（TRAF1, 2, 3和5）进行信号转导。

## 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 *           | 2000 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 |
| <b>储存条件：</b><br>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<br>2：已开启试剂盒可在2-8℃存放7天<br>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℃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℃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。

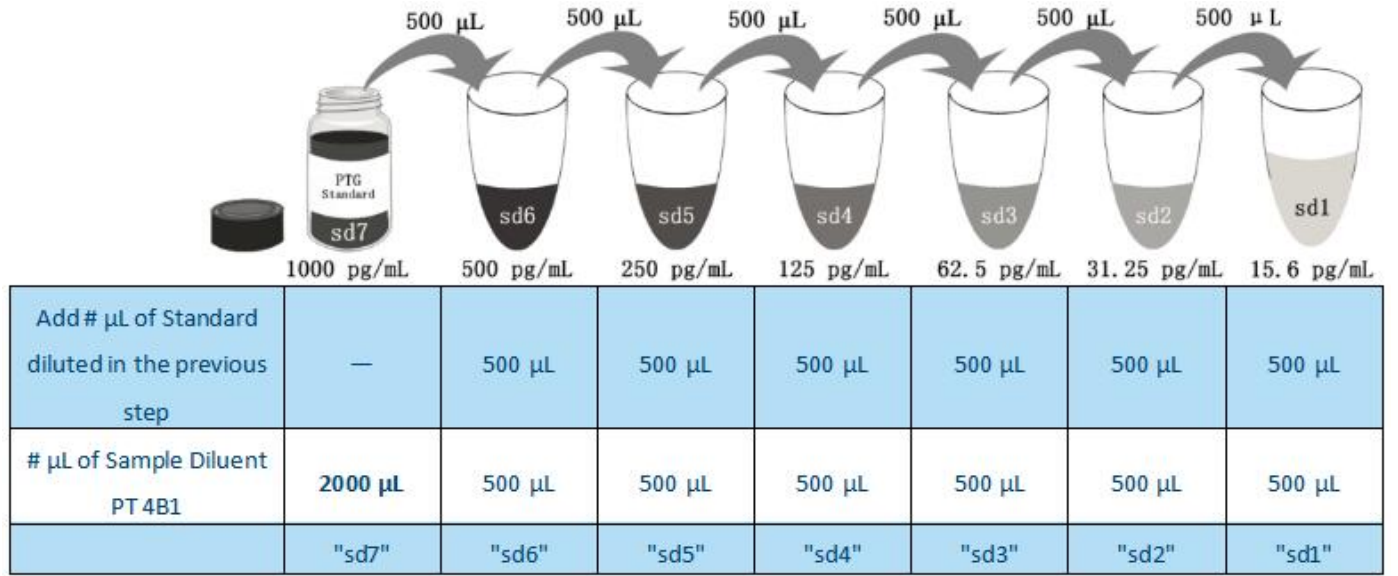
7.3 待检测样本：

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、血浆以及细胞上清样本1:2或1:4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：

使用2 mL PT 4B1 样本稀释液复溶标准品，具体操作如下：



## 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；

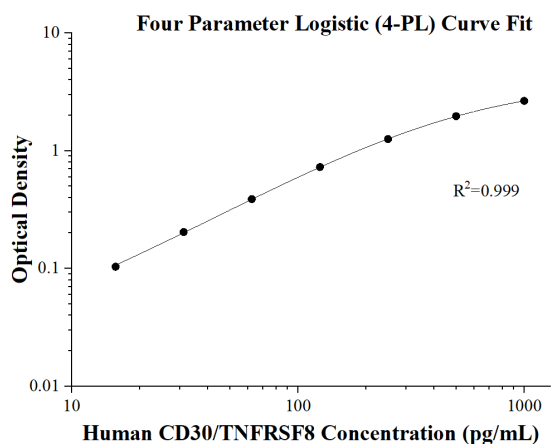
8.10 数据分析：每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD值为纵坐标，使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

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



| (pg/mL) | O.D              | Average | Corrected |
|---------|------------------|---------|-----------|
| 0       | 0.0099<br>0.0113 | 0.0106  | -         |
| 15.6    | 0.1151<br>0.113  | 0.11405 | 0.10345   |
| 31.25   | 0.217<br>0.2121  | 0.21455 | 0.20395   |
| 62.5    | 0.4021<br>0.3958 | 0.39895 | 0.38835   |
| 125     | 0.7387<br>0.7357 | 0.7372  | 0.7266    |
| 250     | 1.2956<br>1.2396 | 1.2676  | 1.257     |
| 500     | 1.9668<br>1.9862 | 1.9765  | 1.9659    |
| 1000    | 2.6622<br>2.6681 | 2.66515 | 2.65455   |

### 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 (pg/mL) | 标准差  | 变异系数CV% |
| 1           | 8  | 479.8       | 11.2 | 2.3     |
| 2           | 8  | 115.9       | 1.5  | 1.3     |
| 3           | 8  | 61.3        | 0.8  | 1.2     |

| 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            | 16 | 484.6       | 11.3 | 2.3     |
| 2            | 16 | 115.3       | 1.7  | 1.5     |
| 3            | 16 | 61.7        | 1.2  | 2.0     |

### 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CD30/TNFRSF8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 (%) |
|------|------|---------|--------|
| 人血清  | 1:16 | 92      | 83-96  |
| 细胞上清 | 1:8  | 98      | 97-99  |
|      | 1:16 | 93      | 89-100 |

## 9.4 样本值

人血清 - 应用本试剂盒，检测人血清样本中人CD30/TNFRSF8的浓度。

| 样本类型       | 平均值 (pg/mL) | 范围 (pg/mL)   |
|------------|-------------|--------------|
| 人血清 (n=16) | 1210.5      | 850.9-2255.6 |

细胞上清 - 在含有20%胎牛血清、50  $\mu$ M  $\beta$ -巯基乙醇、2 mM L-谷氨酰胺、100 U/mL青霉素以及100  $\mu$ g/mL硫酸链霉素的RPMI中培养HDLM-2细胞 ( $3 \times 10^6$ 个/mL)。收集细胞上清，检测人CD30/TNFRSF8含量，检测值为280.2 pg/mL。

## 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CD30/TNFRSF8的灵敏度为2.4 pg/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：

|      |        | 人血清     | 细胞上清    |
|------|--------|---------|---------|
| 1:2  | 均值 (%) | 100     | 100     |
|      | 范围 (%) | -       | -       |
| 1:4  | 均值 (%) | 105     | 111     |
|      | 范围 (%) | 105-106 | 105-118 |
| 1:8  | 均值 (%) | 90      | 107     |
|      | 范围 (%) | 88-91   | 102-112 |
| 1:16 | 均值 (%) | 89      | 103     |
|      | 范围 (%) | 86-91   | 91-115  |

## 9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人CD30/TNFRSF8，加入50 ng/mL以下细胞因子，无明显交叉反应。

Human:

CD30 Ligand

Osteoprotegerin

## 十：参考文献

1. H Dürkop, et al. (1992) Cell. 68(3):421-7.
2. H J Gruss, et al. (1996) Am J Pathol. 149(2):469-81.
3. R Horie, et al. (1998) Semin Immunol. 10(6):457-70.
4. C A van der Weyden, et al. (2017) Blood Cancer J. 7(9):e603.