

人Carbonic Anhydrase IX/CA9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: KE00694

规格: 96T

灵敏度: 2.1 pg/mL

检测范围: 31.25-2000 pg/mL

用途: 此试剂盒用于定量检测血清、血浆、细胞上清以及尿液中的人Carbonic Anhydrase IX/CA9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 | 9 |
| 十：参考文献 | 9 |

一：背景信息

CA9（碳酸酐酶9）可能参与控制细胞增殖和转化，似乎是宫颈肿瘤的一种新型特异性生物标志物。它是一种肿瘤相关抗原，已被证明在宫颈发育不良和宫颈癌的诊断中具有实用价值。该蛋白存在于细胞质膜和细胞核中。在缺氧条件下，CA9表达增加，帮助细胞适应酸性环境。

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 * | 4000 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。
- 6.4 尿液：收集尿液后，1000×g离心20 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 990μL 抗体稀释液进行配制, 轻轻混匀。

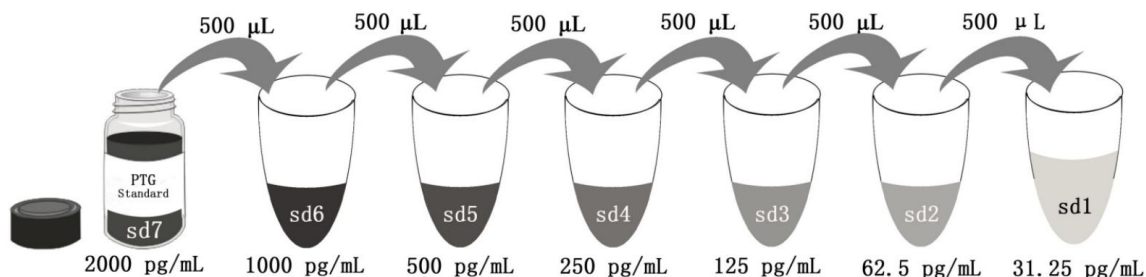
7.3 待检测样本：

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或1:4稀释; 细胞上清样本1:2或1:4稀释; 尿液样本1:2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:



| | | | | | | | |
|---|----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 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" |

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；

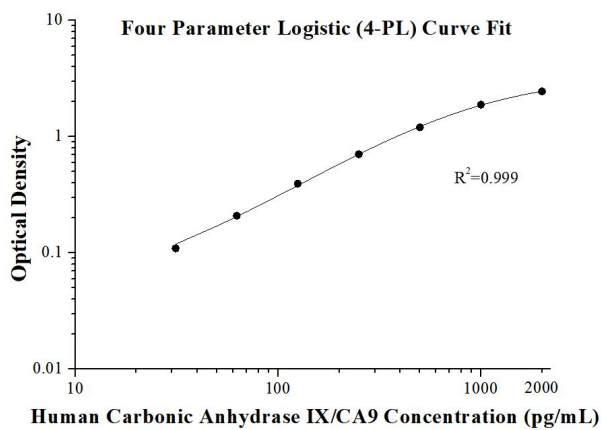
8.10 数据分析：每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD值为纵坐标，使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

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 | 0.0145 0.0163 | 0.0154 | - |
| 31.25 | 0.1143 0.135 | 0.12465 | 0.10925 |
| 62.5 | 0.2059 0.242 | 0.22395 | 0.20855 |
| 125 | 0.372 0.4467 | 0.40935 | 0.39395 |
| 250 | 0.6691 0.7753 | 0.7222 | 0.7068 |
| 500 | 1.1794 1.2578 | 1.2186 | 1.2032 |
| 1000 | 1.8378 1.9607 | 1.89925 | 1.88385 |
| 2000 | 2.4356 2.5077 | 2.47165 | 2.45625 |

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 | 1,291.3 | 32.3 | 2.5 |
| 2 | 8 | 313.5 | 7.9 | 2.5 |
| 3 | 8 | 143.5 | 3.4 | 2.4 |

| 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 | 1,241.4 | 72.6 | 5.8 |
| 2 | 16 | 300.8 | 14.9 | 4.9 |
| 3 | 16 | 148.1 | 9.2 | 6.2 |

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Carbonic Anhydrase IX/CA9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 | 1:4 | 80 | 72-90 |
| | 1:8 | 87 | 74-112 |
| 细胞上清 | 1:32 | 103 | 99-109 |
| | 1:64 | 102 | 99-108 |
| 尿液 | 1:2 | 106 | 103-112 |
| | 1:4 | 111 | 108-114 |

9.4 样本值

人血清 - 应用本试剂盒，检测人血清样本中人Carbonic Anhydrase IX/CA9的浓度。

| 样本类型 | 均值 (pg/mL) | 范围 (pg/mL) |
|--------------|------------|------------|
| 人血清样本 (n=16) | 74.4 | ND-277.8 |

ND*=Non-detectable

尿液 - 应用本试剂盒，检测8份健康人的尿液样本中人Carbonic Anhydrase IX/CA9的浓度，所有样品测值均低于标曲下限31.25 pg/mL。

细胞上清:

HT-29人结肠癌细胞 (1 x 10⁶ 个细胞/mL)在含有10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 µg/mL硫酸链霉素的DMEM培养基中培养。收集细胞上清，并检测人Carbonic Anhydrase IX/CA9的浓度为2853.1 pg/mL。

人外周血单个核细胞PBMC (1 x 10⁶ 个细胞/mL)在含有10% 胎牛血清、5 µM β-巯基乙醇、2 mM L-谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素和100 µg/mL 硫酸链霉素的RPMI培养基中培养。用10 µg/mL 植物血凝素PHA 刺激细胞。在第5天收集细胞上清，并检测人Carbonic Anhydrase IX/CA9的浓度，测值低于标曲下限31.25 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Carbonic Anhydrase IX/CA9的灵敏度为2.1 pg/mL。

9.6 线性

人血清和细胞上清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，尿液加入高浓度的人Carbonic Anhydrase IX/CA9蛋白，梯度稀释后检测样本加标线性，线性数据如下：

(细胞上清样本预先稀释2倍。)

| | | 人血清 | 细胞上清 | 尿液 |
|------|--------|---------|---------|--------|
| 1:2 | 均值 (%) | 100 | 100 | 81 |
| | 范围 (%) | - | - | 77-84 |
| 1:4 | 均值 (%) | 119 | 107 | 87 |
| | 范围 (%) | 114-122 | 101-113 | 83-93 |
| 1:8 | 均值 (%) | 101 | 99 | 87 |
| | 范围 (%) | 92-111 | 94-104 | 79-94 |
| 1:16 | 均值 (%) | 99 | 90 | 93 |
| | 范围 (%) | 87-118 | 88-92 | 83-102 |

9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人Carbonic Anhydrase IX/CA9。

十：参考文献

1. Hilvo, Mika et al. The Journal of biological chemistry vol. 283,41 (2008): 27799-27809.
2. Su, Qi et al. Cell death & disease vol. 10,12 939. 9 Dec. 2019.
3. Pastorekova, Silvia, and Robert J Gillies. Cancer metastasis reviews vol. 38,1-2 (2019): 65-77.