

人Cyclin D1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: KE00344
规格: 96T
灵敏度: 0.16 ng/mL
检测范围: 0.25-16 ng/mL
用途: 此试剂盒用于定量检测细胞裂解液中的人Cyclin D1浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

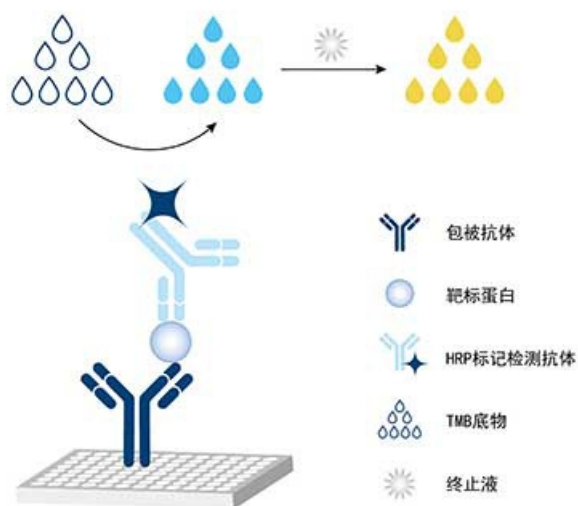
目录

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

CCND1 (cyclin D1), 也被称为PRAD1或BCL1, 属于高度保守的细胞周期蛋白家族, 其特征是在整个细胞周期中蛋白质丰度具有显著的周期性。Cyclin D1主要在细胞核中发挥作用, 作为细胞周期进程的调节剂。Cyclin D1通过作为周期蛋白依赖性激酶4 (CDK)和CDK6的变弹性调节剂调节G1期到S期的转变(PMID: 33317149)。活化的Cyclin D1/CDK4复合体易位进入细胞核, 与Cyclin E/CDK2一起磷酸化视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, RB)蛋白, 并解除对E2F转录因子的抑制作用, 从而调节细胞增殖所需的特定基因的转录(PMID: 8449399, PMID: 9447971)。Cyclin D1转录、积累和泛素化的失调, 以及其同源CDK的结合和过度激活, 导致细胞生长失控。因此, Cyclin D1被认为是乳腺癌、肺癌和黑色素瘤等不同类型癌症的致癌驱动因子(PMID:: 31885322)。除了来自骨髓干细胞系的细胞外, 大多数正常人类细胞都表达Cyclin D1 (PMID: 1386335)。

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 *	32 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 3-ec	样本稀释液 PT 3-ec	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
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 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 1×10^7 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。

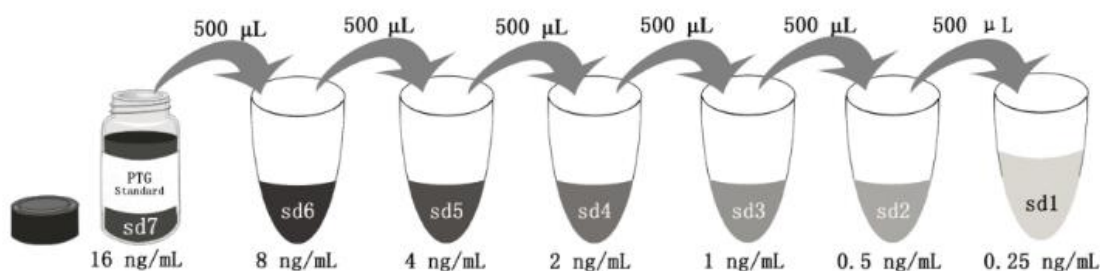
7.3 待检测样本：

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: 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：

使用2 mL PT 3-ec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 3-ec	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；

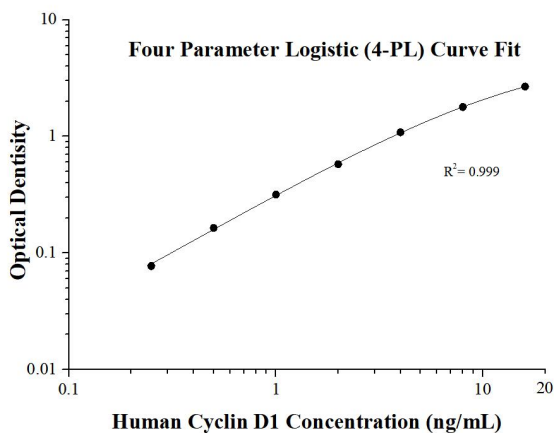
8.10 数据分析：每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD值为纵坐标，使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

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



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.0484 0.0516	0.05	-
0.25	0.1195 0.135	0.12725	0.07725
0.5	0.2032 0.2246	0.2139	0.1639
1	0.3586 0.3748	0.3667	0.3167
2	0.5865 0.669	0.62775	0.57775
4	1.0934 1.1774	1.1354	1.0854
8	1.8516 1.8206	1.8361	1.7861
16	2.7475 2.7044	2.72595	2.67595

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 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%
1	20	7.51	0.27	3.55
2	20	2.02	0.10	4.81
3	20	0.59	0.05	8.95

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	24	9.28	0.84	9.02
2	24	2.20	0.13	6.11
3	24	0.51	0.04	8.21

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Cyclin D1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	1:16	99	91-105
	1:32	86	79-95

9.4 样本值

细胞裂解液

	人Cyclin D1 (ng/mL)	总蛋白 (mg/mL)
HepG2细胞裂解液	14.08	6.00
MCF-7细胞裂解液	11.60	4.20

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Cyclin D1的灵敏度为0.16 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 (%)	86
	范围 (%)	77-94
1:8	均值 (%)	91
	范围 (%)	83-105
1:16	均值 (%)	88
	范围 (%)	80-96

9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人Cyclin D1

十：参考文献

1. Montalto FI. et al. (2020). *Cells*. 9(12):2648.
2. Kato J. et al. (1993). *Genes Dev*. 7(3):331-42.
3. Lundberg AS. et al. (1998). *Mol Cell Biol*. 18(2):753-61.
4. Tchakarska G. et al. (2020). *Cell Cycle*. 19(2):163-178.
5. Inaba T. et al. (1992). *Genomics*. 13(3):565-74.