

人Nectin-4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: KE00346

规格: 96T

灵敏度: 4.1 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、细胞上清、尿液以及细胞裂解液中的人Nectin-4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	9
9.6 线性	9
9.7 特异性	9
十：参考文献	10

一：背景信息

Nectin-4又称PVRL4，是一种I型跨膜糖蛋白，属于免疫球蛋白样黏附分子nectin亚家族，参与钙离子非依赖性细胞间黏附。Nectin-4的胞外结构域包含3个免疫球蛋白样结构域（V型和2个C2型结构域），胞外结构域可被蛋白水解切割，释放出可溶性形式。Nectin-4通过其羧基末端胞质序列与afadin相互作用，并通过V结构域相互作用与nectin-1/PRR1反式相互作用。Nectin-4是麻疹病毒的受体。Nectin-4在人类多种恶性肿瘤中高表达，其异常表达与肿瘤进展和不良预后相关。

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 1	样本稀释液 PT 1	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
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。
- 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℃存放，避免反复冻融。
- 6.5 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℃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。

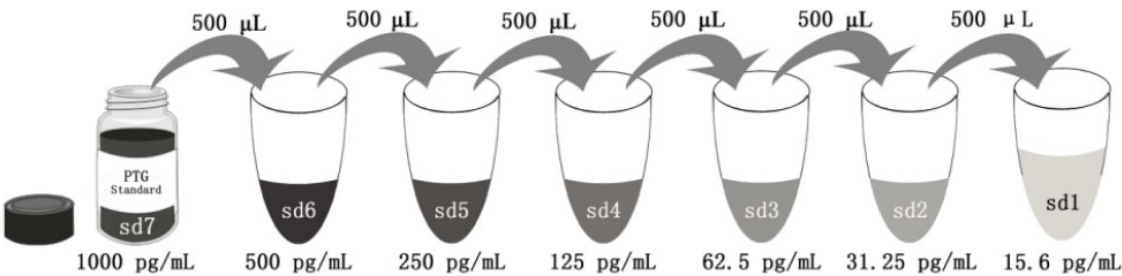
7.3 待检测样本：

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1:2或1:4稀释；细胞上清样本1:10或1:20稀释；尿液样本1:32或1:64稀释；细胞裂解液样本1:200或1:400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 1 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 1	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 μ L，余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本100 μ L/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 $\times$ ）洗涤板条，每孔350-400 μ L，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 μ L HRP标记检测抗体（1 $\times$ ）（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 μ L，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 μ L，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；

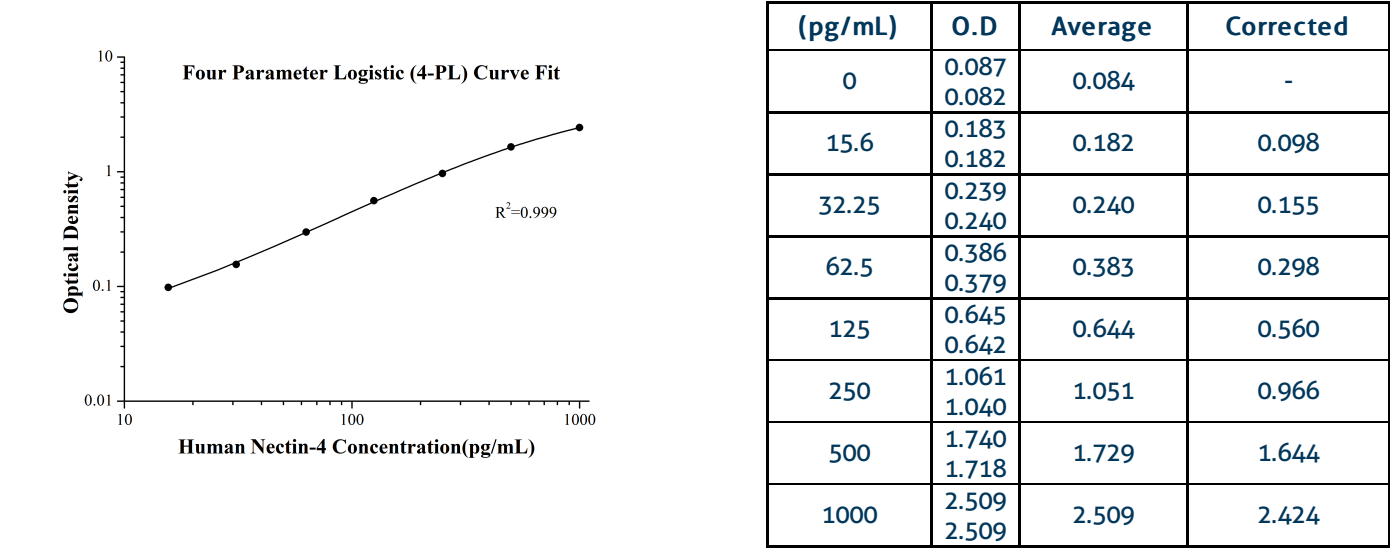
8.10 数据分析：每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD值为纵坐标，使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

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 μ L	120 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
2	HRP标记检测抗体（1 $\times$ ）	100 μ L	40 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
3	显色 TMB	100 μ L	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37°C孵育，避光
4	终止液	100 μ L	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



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	523.1	11.5	2.2
2	20	119.8	5.4	4.5
3	20	29.5	2.5	8.1

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	508.0	11.9	2.3
2	24	117.8	2.7	2.3
3	24	29.6	2.2	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Nectin-4的加标回收率实验，结果如下：

样本类型	稀释倍数	均值(%)	范围(%)
人血清	1:8	97	88-103
	1:16	103	94-113
细胞上清	1:20	105	98-120
	1:40	100	91-112
尿液	1:64	94	83-105
	1:128	90	84-95
细胞裂解液	1:400	86	79-92
	1:800	89	76-100

9.4 样本值

人血清/尿液 - 应用本试剂盒，检测人血清和尿液样本中的人Nectin-4的浓度。

样本值	均值 (pg/mL)	范围 (pg/mL)
人血清 (n=16)	750.2	392.5-1810.2
尿液 (n=8)	3920.6	249.1-9633.4

细胞上清 - 人乳腺癌细胞MCF-7 (5×10^6 cells/mL) 在含有10%胎牛血清、4 mM/L谷氨酰胺、4500 mg/L葡萄糖、100 U/mL青霉素和100 μ g/mL硫酸链霉素的DMEM培养基中培养。收集细胞上清，检测人Nectin-4的浓度为3.2 ng/mL。

细胞裂解液：

	人 Nectin-4 (ng/mL)	总蛋白 (mg/mL)
MCF-7	107.4	4.2
MDA-MB-468	102.1	3.1

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Nectin-4的灵敏度为 4.1 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：

(细胞上清样本预先稀释2.5倍；尿液样本预先稀释8倍；细胞裂解液样本预先稀释50倍。)

稀释倍数		人血清	细胞上清	尿液	细胞裂解液
1:2	均值 (%)	100	100	100	100
	范围 (%)	-	-	-	-
1:4	均值 (%)	113	97	111	108
	范围 (%)	112-116	96-99	108-114	107-110
1:8	均值 (%)	117	97	116	116
	范围 (%)	113-120	95-100	113-118	113-119
1:16	均值 (%)	117	98	121	120
	范围 (%)	113-121	98-99	119-123	119-120

9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人Nectin-4，加入50 ng/mL以下细胞因子，无明显交叉反应。

Human:

IGSF4A/SynCAM1

IGSF4B/SynCAM3

IGSF4D/SynCAM2

Nectin-1

Nectin-2

十：参考文献

1. N Reymond, et al. (2001) J Biol Chem. 276(46):43205-15.
2. Stéphanie Fabre-Lafay. (2005) J Biol Chem. 280(20):19543-50.
3. Martin J Barron, et al. (2008) Hum Mol Genet. 17(22):3509-20.
4. Michael D Mühlebach, et al. (2011) Nature. 480(7378):530-3.
5. Wafa Bouleftour, et al. (2022) Mol Cancer Ther. 21(4):493-501.