

## 小鼠CCL17/TARC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: KE10096  
规格: 96T  
灵敏度: 3.9 pg/mL  
检测范围: 15.6 - 1000 pg/mL  
用途: 此试剂盒用于定量检测细胞上清中的小鼠CCL17/TARC 浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

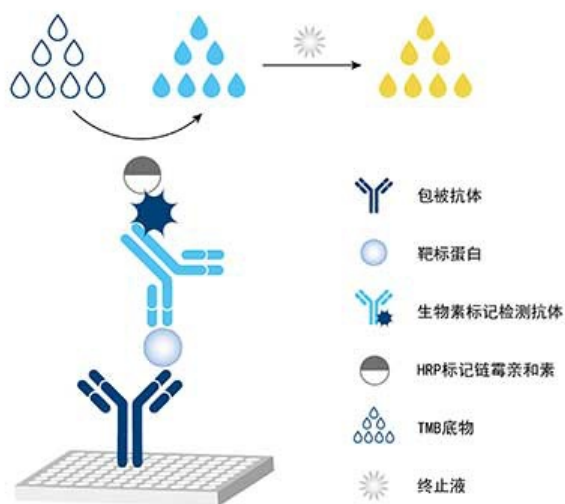
## 目录

|            |   |
|------------|---|
| 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    | 7 |
| 9.5 灵敏度    | 8 |
| 9.6 线性     | 8 |
| 十：参考文献     | 8 |

## 一：背景信息

胸腺和激活调节趋化因子 (TARC/CCL17) 是CC或 $\beta$ -趋化因子家族的成员。TARC/CCL17在胸腺中组成性表达，由树突状细胞、内皮细胞、角质形成细胞和成纤维细胞产生。它是CCR4的配体，主要在Th2淋巴细胞、嗜碱性粒细胞和自然杀伤细胞上表达。在免疫刺激时，TARC可以选择性地招募皮肤归巢的CLA+记忆CD4+ T细胞到皮肤中。血清TARC水平与特应性皮炎的疾病活动性密切相关。

## 二：检测原理



### ◀双抗夹心模式图 (检测抗体标记生物素)

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 X 12条  | 1 块 |
| Protein standard                                    | 标准品 - 冻干粉状 *            | 2000 pg/瓶 | 2 瓶 |
| Detection Antibody (100×),<br>biotinylated          | 生物素标记检测抗体浓缩液 (100×) **  | 120 μL/支  | 1 支 |
| Streptavidin-horseradish<br>peroxidase (HRP) (100×) | HRP标记链霉亲和素浓缩液 (100×) ** | 120 μL/支  | 1 支 |
| Sample Diluent PT 1                                 | 样本稀释液 PT 1              | 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<br>(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 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。

## 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 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 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 HRP标记链霉亲和素 (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标记的链霉亲和素浓缩液 (100×) 加 990 μL 抗体稀释液进行配制, 轻轻混匀。

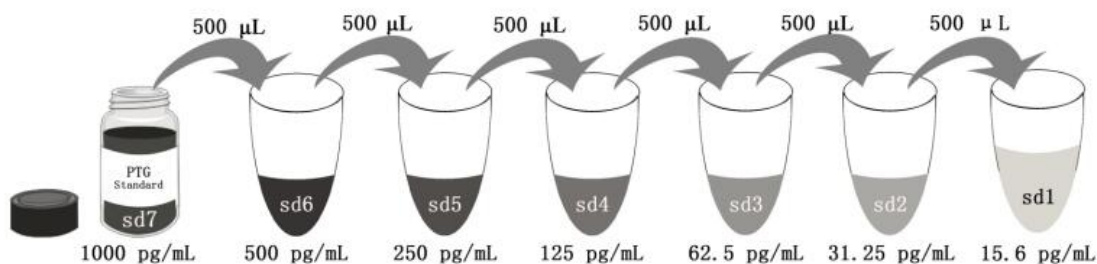
### 7.4 待检测样本：

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。

### 7.5 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20-30 min(检测抗体浓缩液、HRP标记链霉亲和素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 检测抗体(1×)(参照试剂准备部分7.2),盖上封板膜,37°C孵育1 h;

8.6 重复步骤8.4;

8.7 每孔加100 μL HRP标记链霉亲和素(1×)(参照试剂准备部分7.3),盖上封板膜,37°C孵育40 min;

8.8 重复步骤8.4;

8.9 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);

8.10 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)

8.11 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;

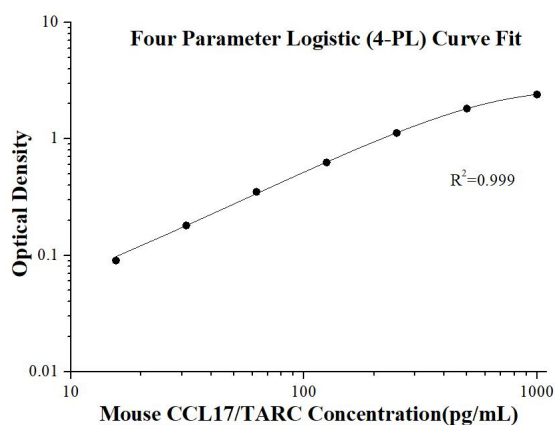
8.12 数据分析:每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值,设置复孔,取其平均值。以标准品的浓度为横坐标,OD 值为纵坐标,使用专业软件(如Origin、ELISACalc等)进行四参数拟合(4-PL),根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度,乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

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  | 检测抗体(1×)                                     | 100 μL | 60 分钟    | 4 次   | 覆膜后37°C孵育    |
| 3  | HRP标记链霉亲和素(1×)                               | 100 μL | 40 分钟    | 4 次   | 覆膜后37°C孵育    |
| 4  | 显色 TMB                                       | 100 μL | 15-20 分钟 | 不需要洗涤 | 覆膜后37°C孵育,避光 |
| 5  | 终止液  | 100 μL | 0 分钟     | 不需要洗涤 | -            |
| 6  | 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       | 0.0763<br>0.0785 | 0.0774  | -         |
| 15.6    | 0.1745<br>0.1607 | 0.1676  | 0.0902    |
| 31.25   | 0.2604<br>0.2551 | 0.25775 | 0.18035   |
| 62.5    | 0.4356<br>0.421  | 0.4283  | 0.3509    |
| 125     | 0.7166<br>0.6929 | 0.70475 | 0.62735   |
| 250     | 1.224<br>1.1821  | 1.20305 | 1.12565   |
| 500     | 1.8894<br>1.9079 | 1.89865 | 1.82125   |
| 1000    | 2.4874<br>2.4803 | 2.48385 | 2.40645   |

### 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 | 777.4       | 69.6 | 9.0     |
| 2           | 20 | 213.8       | 7.0  | 3.3     |
| 3           | 20 | 51.9        | 1.7  | 3.3     |

| 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 | 714.1       | 71.6 | 10.0    |
| 2           | 24 | 220.4       | 9.8  | 4.4     |
| 3           | 24 | 50.4        | 2.1  | 4.3     |

### 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，进行小鼠CCL17/TARC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 (%) |
|------|------|---------|--------|
| 细胞上清 | 1:4  | 84      | 71-93  |
|      | 1:8  | 98      | 76-129 |

## 9.4 样本值

细胞上清-小鼠肺(2个肺, 1-2 mm/片)在含10%胎牛血清的RPMI中培养3天后。收集细胞上清, 并检测小鼠CCL17/TARC的浓度为415.3 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, 此试剂盒中小鼠CCL17/TARC的灵敏度为3.9 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    |
|------|--------|---------|
| 1:2  | 均值 (%) | 100     |
|      | 范围 (%) | -       |
| 1:4  | 均值 (%) | 98      |
|      | 范围 (%) | 84-117  |
| 1:8  | 均值 (%) | 104     |
|      | 范围 (%) | 86-122  |
| 1:16 | 均值 (%) | 109     |
|      | 范围 (%) | 105-113 |

## 十：参考文献

1. Imai T. et al. (1996) J Biol Chem. 271:21514-21.
2. Sallusto F. et al. (1998) Eur J Immunol. 28:2760-9.
3. Campbell JJ. et al. (1999) Nature. 400:776-80.
4. Vestergaard C. et al. (1999) J Clin Invest. 104:1097-105.
5. Sekiya T. et al. (2000) J Immunol. 165:2205-13.
6. Yu B. et al. (2000) J Dermatol Sci. 30:29-6.