

小鼠CD134/OX40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: KE10231

规格: 96T

灵敏度: 0.9 pg/mL

检测范围: 39-2500 pg/mL

用途: 此试剂盒用于定量检测血清、血浆、细胞上清以及组织裂解液中的小鼠CD134/OX40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 | 5 |
| 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 | 8 |
| 9.6 线性 | 9 |
| 9.7 特异性 | 9 |
| 十：参考文献 | 9 |

一：背景信息

D134 (OX40) 属于TNFR超家族受体的一种。它主要在活化的T细胞上表达，通过其特异性配体 CD134L (OX40L) 被激活，并作为T细胞的共刺激分子发挥作用。CD134 - CD134L 的相互作用被提议作为治疗自身免疫性疾病的一个潜在治疗靶点。CD134 能够与 TRAF2、TRAF3 和 TRAF5 发生相互作用。

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 * | 5000 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 3 | 样本稀释液 PT 3 | 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 |
| 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℃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°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 组织裂解液：

1) 使用预冷的1×PBS清洗组织，吸干水分后，用剪刀剪碎，加入适量的裂解液（加PMSF至裂解液中，终浓度为1 mM，每100 mg组织加入1 mL裂解液，不同样本需自行优化）；

2) 转移到预冷玻璃匀浆器中，匀浆约20-30下。匀浆效果与细胞类型和组织类型相关，不同细胞或组织所需的匀浆次数有所不同，需自行优化；

3) 匀浆20-30次后取约2-3 μL细胞或组织匀浆液滴在盖玻片上并在显微镜下观察，如见细胞核周晕环或完整的细胞形态，说明细胞仍完整。如果有70-80%的细胞均无核周晕环和完整细胞形态，说明细胞已经充分破碎，则进行下一步实验。否则，重新匀浆10-30次直到细胞至少90%已经破碎；

4) 细胞破碎后8000×g-10000×g离心5 min，分离上清，分装后-80°C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 990 μL 抗体稀释液进行配制，轻轻混匀。

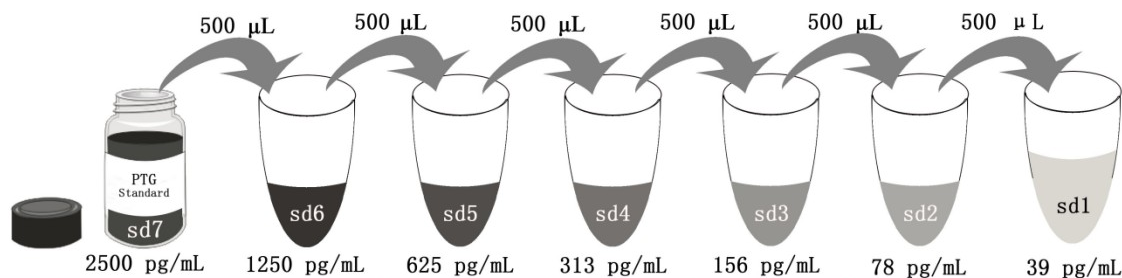
7.3 待检测样本：

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：小鼠血清和血浆样本1:2稀释；细胞上清样本1:2或1:4稀释；组织裂解液样本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 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 | 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；

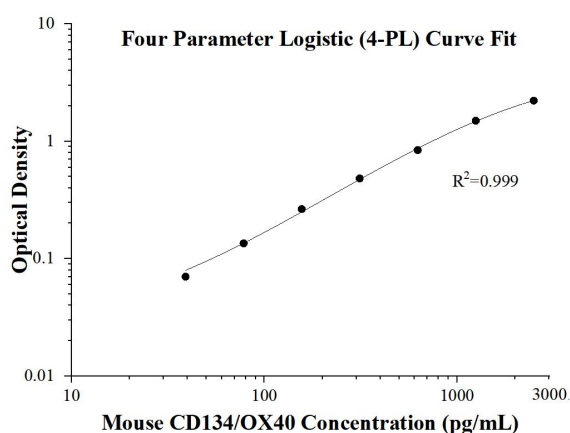
8.10 数据分析：每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD值为纵坐标，使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

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 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



| (pg/mL) | O.D | Average | Corrected |
|---------|------------------|---------|-----------|
| 0 | 0.0635 0.0578 | 0.0607 | - |
| 39 | 0.1387 0.123 | 0.1309 | 0.0702 |
| 78 | 0.2075 0.1833 | 0.1954 | 0.1348 |
| 156 | 0.336 0.314 | 0.3250 | 0.2644 |
| 313 | 0.5732 0.5135 | 0.5434 | 0.4827 |
| 625 | 0.9691 0.8378 | 0.9035 | 0.8428 |
| 1250 | 1.6191 1.497 | 1.5581 | 1.4974 |
| 2500 | 2.3459 2.2199 | 2.2829 | 2.2223 |

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 | 1,262.5 | 54.8 | 4.3 |
| 2 | 8 | 301.1 | 7.6 | 2.5 |
| 3 | 8 | 148.0 | 8.7 | 5.9 |

| 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 | 1,313.3 | 82.1 | 6.3 |
| 2 | 16 | 303.2 | 12.1 | 4.0 |
| 3 | 16 | 149.5 | 11.7 | 7.8 |

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CD134/OX40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 (%) |
|-------|------|---------|--------|
| 小鼠血清 | 1:8 | 82 | 79-84 |
| 细胞上清 | 1:8 | 92 | 76-103 |
| 细胞裂解液 | 1:32 | 92 | 88-96 |

9.4 样本值

小鼠血清 - 应用本试剂盒，检测小鼠血清样本中小鼠CD134/OX40的浓度。

| 样本类型 | 均值 (pg/mL) | 范围 (pg/mL) |
|---------------|------------|--------------|
| 小鼠血清样本 (n=16) | 362.6 | 186.2-1279.9 |

细胞上清 - 小鼠脾脏用足够的PBS冲洗以覆盖器官，并保存在冰上。用组织匀浆器将组织匀浆，在添加10%胎牛血清、2 mM L-谷氨酰胺、100 U/mL青霉素和100 mg/mL硫酸链霉素的RPMI 1640培养基中培养3天。去除细胞培养上清液，测定小鼠CD134/OX40。

| 刺激条件 | 3天 (pg/mL) |
|------|------------|
| 未刺激 | ND |
| 刺激 | 583.7 |

ND*=Non-detectable

组织裂解液

| | 小鼠CD134/OX40 (pg/mL) | 总蛋白量 (mg/mL) |
|-----------|----------------------|--------------|
| 小鼠脾脏组织裂解液 | 4356.0 | 3.0 |

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CD134/OX40的灵敏度为0.9 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：

(组织裂解液样本预先稀释2倍。)

| | | 小鼠血清 | 细胞上清 | 组织裂解液 |
|------|--------|--------|---------|---------|
| 1:2 | 均值 (%) | 100 | 100 | 100 |
| | 范围 (%) | - | - | - |
| 1:4 | 均值 (%) | 97 | 107 | 98 |
| | 范围 (%) | 95-99 | 98-116 | 96-100 |
| 1:8 | 均值 (%) | 99 | 104 | 102 |
| | 范围 (%) | 87-111 | 91-117 | 99-104 |
| 1:16 | 均值 (%) | - | 105 | 113 |
| | 范围 (%) | - | 101-109 | 112-114 |

9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组小鼠CD134/OX40。

十：参考文献

1. Webb, Gwilym J et al. Clinical reviews in allergy & immunology vol. 50,3 (2016): 312-32.
2. Croft, Michael et al. Immunological reviews vol. 229,1 (2009): 173-91.