

小鼠CD40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: KE10196
规格: 96T
灵敏度: 2.8 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、细胞上清以及组织裂解液中的小鼠CD40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 | 9 |
| 9.6 线性 | 9 |
| 9.7 特异性 | 9 |
| 十：参考文献 | 9 |

一：背景信息

CD40又名TNFRSF5和Bp50，是一种I型跨膜蛋白，属于肿瘤坏死因子受体（TNFR）家族。CD40在B细胞、树突状细胞（DC）、单核细胞、血小板和巨噬细胞，以及肌成纤维细胞、成纤维细胞、上皮细胞和内皮细胞等非造血细胞中均有表达。它是TNFSF5/CD40L的受体。CD40L/CD40相互作用对免疫球蛋白（Ig）同种型转换、生发中心形成和B细胞记忆的形成至关重要。

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 |
| 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。

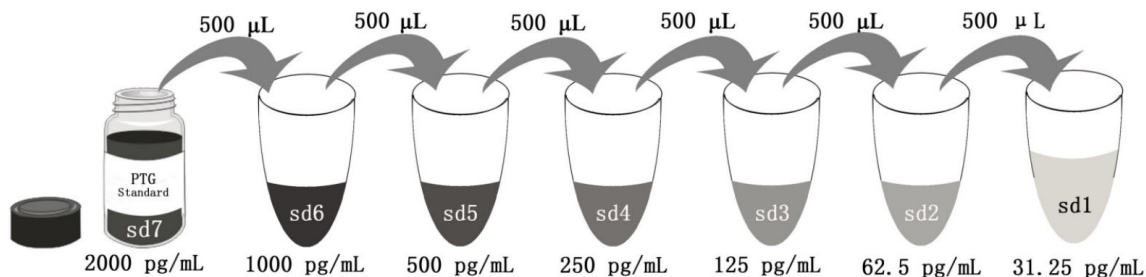
7.3 待检测样本：

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、血浆和细胞上清样本1:2稀释；组织裂解液样本1:5或1:10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；

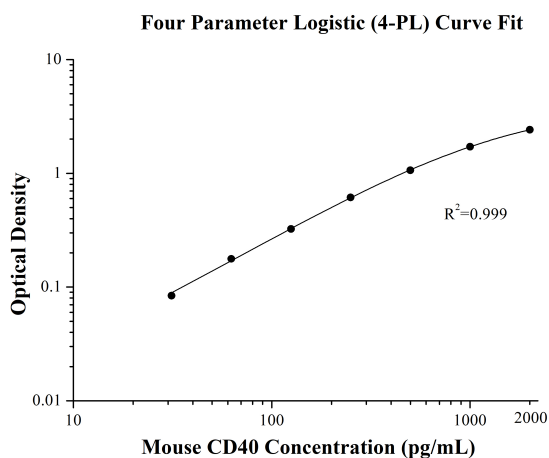
8.10 数据分析：每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD值为纵坐标，使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

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 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 | 0.069 0.067 | 0.068 | - |
| 31.25 | 0.149 0.155 | 0.152 | 0.084 |
| 62.5 | 0.243 0.246 | 0.245 | 0.177 |
| 125 | 0.394 0.389 | 0.392 | 0.324 |
| 250 | 0.688 0.679 | 0.683 | 0.615 |
| 500 | 1.178 1.088 | 1.133 | 1.065 |
| 1000 | 1.779 1.789 | 1.784 | 1.716 |
| 2000 | 2.513 2.452 | 2.482 | 2.414 |

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 | 1,113.4 | 40.9 | 3.7 |
| 2 | 8 | 264.9 | 9.3 | 3.5 |
| 3 | 8 | 132.7 | 3.7 | 2.8 |

| 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 | 1,129.8 | 41.2 | 3.6 |
| 2 | 16 | 268.9 | 10.2 | 3.8 |
| 3 | 16 | 132.7 | 4.0 | 3.0 |

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CD40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 | 1:2 | 78 | 77-81 |
| 细胞上清 | 1:2 | 96 | 87-111 |
| 组织裂解液 | 1:20 | 79 | 72-88 |

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CD40的浓度

| 样本类型 | 均值 (pg/mL) | 检出率 (%) | 范围 (pg/mL) |
|---------------|------------|---------|------------|
| 小鼠血清样本 (n=24) | 55.5 | 50 | ND-336.5 |

ND*=Non-detectable

细胞上清:

用组织匀浆器将小鼠脾脏匀浆。在含10%胎牛血清的RPMI培养基中培养细胞(1×10^6 cells/mL)，细胞分别在未刺激或用1 μ g/mL脂多糖LPS刺激下培养3天。收集细胞上清，并检测小鼠CD40的浓度。样本检测值均低于检测下限31.25 pg/mL。

用组织匀浆器将小鼠肾脏匀浆。在含10%胎牛血清的RPMI培养基中培养细胞(1×10^6 cells/mL)，细胞分别在未刺激或用1 μ g/mL脂多糖LPS刺激下培养3天。收集细胞上清，并检测小鼠CD40的浓度。样本检测值均低于检测下限31.25 pg/mL。

用组织匀浆器将小鼠肺匀浆。在含10%胎牛血清的RPMI培养基中培养细胞(1×10^6 cells/mL)，细胞分别在未刺激或用12.5 μ g/mL脂多糖LPS刺激下培养2天。收集细胞上清，并检测小鼠CD40的浓度。

| 刺激条件 | 2天 (pg/mL) |
|------|------------|
| 未刺激 | 95.6 |
| 刺激 | 534.9 |

组织裂解液

| | 小鼠CD40 (ng/mL) | 总蛋白量 (mg/mL) |
|-------------------|----------------|--------------|
| Mouse spleen组织裂解液 | 16.8 | 3.0 |
| Mouse heart组织裂解液 | 1.9 | 3.0 |
| Mouse kidney组织裂解液 | 2.8 | 4.0 |
| Mouse liver组织裂解液 | 2.2 | 1.0 |
| Mouse lung组织裂解液 | 15.3 | 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CD40的灵敏度为2.8 pg/mL。

9.6 线性

小鼠血清和细胞上清加入高浓度的小鼠CD40蛋白，梯度稀释后检测样本加标线性，组织裂解液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2.5倍。)

| | | 小鼠血清 | 细胞上清 | 组织裂解液 |
|------|--------|---------|---------|--------|
| 1:2 | 均值 (%) | 100 | 105 | 100 |
| | 范围 (%) | 100-101 | 100-116 | - |
| 1:4 | 均值 (%) | 98 | 103 | 101 |
| | 范围 (%) | 97-99 | 98-114 | 80-113 |
| 1:8 | 均值 (%) | 100 | 107 | 110 |
| | 范围 (%) | 99-101 | 99-121 | 77-128 |
| 1:16 | 均值 (%) | 97 | 104 | 106 |
| | 范围 (%) | 97-98 | 97-117 | 71-125 |

9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组小鼠CD40，加入50 ng/mL以下细胞因子，无明显交叉反应。

Human:

Mouse:

CD40

CD40 Ligand

Fas

十：参考文献

1. Foy, T M et al. The Journal of experimental medicine vol. 180,1 (1994): 157-63.
2. van Kooten, C, and J Banchereau. Journal of leukocyte biology vol. 67,1 (2000): 2-17.
3. Ferrari, S et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America vol. 98,22 (2001): 12614-9.
4. Elgueta, Raul et al. Immunological reviews vol. 229,1 (2009): 152-72.