

人上皮细胞粘附分子 (Ep-CAM/CD326) ELISA 试剂盒

货号: PMK1402ES

保存: 2-8℃避光保存 6 个月

规格: 48T/96T

检测范围: 78.13-5000pg/mL **灵敏度:** 47 pg/mL

精密性: 板内变异系数<10%, 板间变异系数<10%

回收率范围: 80-120%

特异性: 检测具有高灵敏度和优良的特异性。未观察到和人上皮细胞粘附分子 (Ep-CAM/CD326) 类似物之间的显著交叉反应或干扰。

适用样本: 血清、血浆、组织匀浆、细胞裂解液、细胞培养上清和其他生物体液

检测原理

该试剂盒采用双抗夹心酶联免疫吸附法原理。酶标板预包被亲和纯化的抗人 Ep-CAM/CD326 的抗体。将含有人 Ep-CAM/CD326 的样品或标准品加入到酶标板中, 与包被抗体反应。再加入生物素标记的检测抗体, 并与酶标板上捕获的人 Ep-CAM/CD326 结合。接着, 加入链霉亲和素-辣根过氧化物酶 (SA-HRP) 以形成固相抗体-人 Ep-CAM/CD326-生物素标记抗体-SA-HRP 的夹心复合物。然后, 将 TMB 溶液加入孔中并进行孵育, 酶促反应产生蓝色物质, 加入终止液后, 变成黄色。在 450nm 波长下测定吸光值。最后通过建立标准曲线, 根据 OD 值来计算样品中人 Ep-CAM/CD326 的浓度。

试剂盒组成及保存

未开封的试剂盒可在 2-8℃保存 6 个月; 如果开封使用后, 请按照下表中的条件分别保存各组分。

| 试剂盒组分 | 规格 | | 储存条件 |
|--------------------------|----------|----------|----------|
| | 48T | 96T | |
| 预包被微孔板 | 48 孔 | 96 孔 | -20℃ |
| 标准品 | 冻干粉, 1 支 | 冻干粉, 2 支 | -20℃ |
| 检测试剂 A(生物素化抗体 100×) | 60 μL | 120 μL | -20℃ |
| 检测试剂 B(SA-HRP 酶结合物 100×) | 60 μL | 120 μL | -20℃ |
| 标准品/样品稀释液 | 10mL | 20mL | 2-8℃ |
| 检测试剂 A 稀释液 | 6.5mL | 13mL | 2-8℃ |
| 检测试剂 B 稀释液 | 6.5mL | 13mL | 2-8℃ |
| 洗涤液 (25×) | 15mL | 30mL | 2-8℃ |
| 底物溶液 (TMB) | 5mL | 10mL | 2-8℃避光保存 |
| 终止液 | 5mL | 10mL | 2-8℃ |
| 封板膜 | 2 张 | 4 张 | 室温 |
| 说明书 | 1 份 | 1 份 | 室温 |

自备耗材

酶标仪 (能测 450nm 处的吸光度)

多通道移液器或自动洗板机

恒温箱、低温离心机

可调节式移液枪及枪头

去离子水

试剂准备

注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。

1. 使用前将所有试剂平衡至室温（18-25℃）。按照酶标仪说明书进行设置检测波长为 450nm，并在读板前预热 15 分钟。
2. 洗涤液：取浓缩洗涤液，根据检测数量，用去离子水或蒸馏水 1：24 稀释，混匀后备用（浓缩洗涤液如有结晶可 40℃水浴溶解后再使用）。
3. 检测试剂 A 工作液：实验前计算所需量（100 μL/孔）。在准备工作中，应该准备比计算量稍微多一点（多 100-200 μL）。使用前 15 分钟，将原液管离心，用检测试剂 A 稀释液将 100×浓缩检测试剂 A 稀释至 1×工作液（如：10 μL 检测试剂 A + 990 μL 检测试剂 A 稀释液）。
4. 检测试剂 B 工作液：实验前计算所需量（100 μL/孔）。在准备工作中，应该准备比计算量稍微多一点（多 100-200 μL）。使用前 15 分钟，将原液管离心，用检测试剂 B 稀释液将 100×浓缩检测试剂 B 稀释至 1×工作液（如：10 μL 检测试剂 B + 990 μL 检测试剂 B 稀释液）。
5. 标准工作液：首先，标准品 1000×g 离心 1min，加入 1mL 标准品/样品稀释液，使其静止 10min 再轻柔混匀，这就是 5000pg/mL 工作储备液，然后取 7 个 EP 管，每管内加入 500 μL 标准品/样品稀释液。吸取 500 μL 5000pg/mL 标准品稀释液到第一个管内再混匀即为 2500pg/mL 工作液。按照下表将 500 μL 的溶液从前管移到后管中。在下次转移前，将每管彻底混匀。设定 7 个梯度稀释标准品如 5000pg/mL, 2500pg/mL, 1250pg/mL, 625pg/mL, 312.5pg/mL, 156.25pg/mL, 78.13pg/mL, 最后 1 个装有标准品/样品稀释液的 EP 管是空白对照作为 0pg/mL。

| | 标准品体积 | 标准品/样品稀释液 体积 (μL) | 标准品浓度 (pg/mL) |
|--------|-------------------------------|----------------------|---------------|
| Std. 1 | 1000μL 5000pg/mL | 0 | 5000 |
| Std. 2 | 500μL of Std. 1 (5000pg/mL) | 500 | 2500 |
| Std. 3 | 500μL of Std. 2 (2500pg/mL) | 500 | 1250 |
| Std. 4 | 500μL of Std. 3 (1250pg/mL) | 500 | 625 |
| Std. 5 | 500μL of Std. 4 (625pg/mL) | 500 | 312.5 |
| Std. 6 | 500μL of Std. 5 (312.5pg/mL) | 500 | 156.25 |
| Std. 7 | 500μL of Std. 6 (156.25pg/mL) | 500 | 78.13 |
| Blank | 0 | 500 | 0 |

注意：每次实验，请使用新配制的标准品，工作储备液可 2-8℃保存一周。

样品收集

血清：让血样在室温下凝结 2 小时或在 2-8℃下过夜，然后在 2-8℃下 2000×g 离心 15 分钟。随后立即取上清液进行检测，或存储在-20℃或-80℃备用。

血浆：使用 EDTA 或肝素作为抗凝剂收集血浆。采集后 30 分钟内，在 2-8℃, 2000×g 条件下离心样品 15 分钟，随后立即取上清液进行检测，或存储在-20℃或-80℃下备用。

组织匀浆：应在预冷的 PBS 中冲洗组织，彻底清除多余的血液，称重，切成小块。然后在冰上的采用玻璃匀质器在 PBS（组织重量（g）：PBS（mL）体积=1：9）中均质化组织块。使用超声波细胞破碎机对所得匀质悬浮液进行超声处理，直到溶液澄清。然后将匀浆在 10000×g 下离心 5 分钟。随后立即取上清液进行检测，或存储在-20℃或-80℃下备用。

细胞裂解物：对于粘附细胞，用适量预冷的 PBS 轻轻清洗细胞，并用胰蛋白酶分离细胞。以 1000×g 离心 5 分钟收集细胞（悬浮细胞可直接离心收集）。弃上清，用冷 PBS 清洗细胞 3 次。以浓度为 5×10^6 个细胞/mL 预冷 PBS 重新悬浮细胞。重复冻融数次，直到细胞完全溶解。1500×g, 2-8℃离心 10min。随后立即取上清液进行检测，或存储在-20℃或-80℃下备用。

细胞培养上清和其他生物体液：在 1500×g, 2-8℃条件下离心样品 15 分钟。随后立即取上清液进行检测，或存储在-20℃或-80℃下备用。

产品说明书

注意：不要使用严重溶血或脂血的标本。如果样品要在 6 天内使用，则可以将其储存在 2-8℃，长期保存需分装存储在-20℃或-80℃，避免反复冻融。测定前，应将冷冻样品缓慢升至室温并轻轻混合。实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本用标准品/样品稀释液稀释几个不同倍数做预实验确定合适的稀释倍数，计算结果乘以稀释倍数。

实验步骤

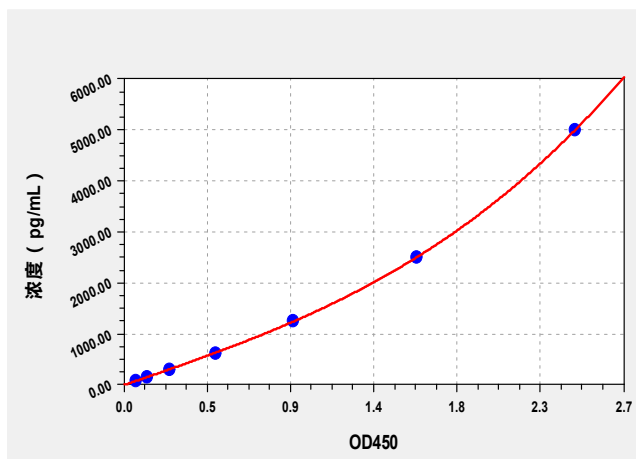
1. 从板框上取下待用的微孔板条，将剩余的板条放回装有干燥剂的铝箔袋中，然后重新密封保存。
2. 将标准工作溶液加入前两列，每个浓度设置一个复孔(每孔 100 μL)。其余孔加入 100 μL 待测样本(建议通过预实验确定待检样本的稀释倍数)。盖上试剂盒提供的封板膜。37℃孵育 90 分钟。
3. 手工洗板：弃去每孔中的液体，每孔加入 350 μL 洗涤液。浸泡 30 秒再倒出每孔中液体并在干净的吸水纸上拍干。重复这个洗涤步骤，共 3 遍。洗板机洗板：选择洗涤 3 次程序洗板后拍干。
4. 向每孔中加入 100 μL 的检测试剂 A 工作液。盖上封板膜。37℃孵育 60 分钟。
5. 弃去每孔中的液体，重复步骤 3 的洗涤过程 3 遍。
6. 向每孔中加入 100 μL 的检测试剂 B 工作液。盖上封板膜。37℃孵育 30 分钟。
7. 弃去每孔中的液体，重复步骤 3 的洗涤过程 3 遍。
8. 每孔加底物溶液(TMB) 100 μL。盖上新的封板膜。37℃避光孵育 10-20 分钟(当标品浓度梯度后三孔有明显蓝色梯度，前三孔的梯度不明显时即可终止)。
9. 每孔加入 50 μL 的终止液，顺序与加入底物溶液(TMB)的顺序一致，轻轻晃动混匀。
10. 确保酶标板孔底无气泡水雾等，立即在 450nm 测量每孔的吸光度 OD 值。

计算

每个标准品和样品的重复读数分别取平均值，然后减去零孔 OD 的平均值。以 x 轴为 OD 值，y 轴为标准品浓度。拟合一条标准曲线，将样本减去零孔后的 OD 值作为 x 带入计算 y (浓度)。如果样品被稀释，从标准曲线上读出的浓度必须乘以稀释系数。

结果展示

典型标准曲线 ($R^2 \geq 0.99$)



人上皮细胞粘附分子(Ep-CAM/CD326)标准曲线。数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。终止液有一定的腐蚀性，操作时请做好防护措施。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。收到试剂盒后，未开封的试剂盒可在 2-8℃ 下保存 1 个月。如果试剂盒在 1 个月内不使用，请在收到试剂盒后，将每个组件分别存放在上表中指示的温度下。
4. 新打开的 ELISA 酶标板可能含有水雾样物质，此为正常现象，不会对实验结果产生任何影响。未用完的板条应立即放回装有干燥剂的铝箔袋中，重新密封并在-20℃下存储。

产品说明书

5. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
6. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。
7. 溶解含有蛋白质溶液时，应始终避免起泡。
8. 不得重复使用稀释后的工作液。
9. 为了得到准确的实验结果，在孵育过程中，必须确保封板膜将酶标板密封。
10. 在使用自动洗板机时，添加清洗缓冲液后，在清洗步骤之间添加 30 秒的浸泡时间可提高分析精度。
11. 底物溶液保存过程中应无色，加入到酶标板中之后底物溶液应从无色变为渐变蓝色。
12. 终止液应按照与加底物溶液(TMB)相同的顺序添加到酶标板中。添加终止液后，孔中溶液的颜色将从蓝色变为黄色。绿色的孔表明终止液未与底物溶液充分混合，应轻拍孔板使其混匀。

疑难解答

| 问题 | 可能原因 | 解决措施 |
|--------|-----------|--------------------|
| 标曲线性不好 | 标准品稀释不正确 | 确保标准品按照推荐方法溶解和稀释 |
| | 移液不准确 | 定期校准移液器并检查枪头密封性 |
| | 反应液蒸发 | 用封板膜密封酶标板 |
| | 洗板不彻底 | 足够的洗涤次数和加入足量洗涤液 |
| | 孔底有异物 | 读数前清洁板底 |
| 显色弱或无 | 试剂反应不充分 | 确保孵育时间并按推荐温度孵育 |
| | 试剂体积添加不足 | 检查移液器并严格按照操作步骤操作 |
| | 稀释不正确 | 检查试剂稀释步骤 |
| | 酶结合物失活 | 混合酶结合物和底物，通过显色反应检查 |
| OD 值低 | 酶标仪设置不正确 | 检查仪器波长 |
| | 没加终止液 | 加入适量终止液 |
| | 读板时等待时间太长 | 及时读板 |
| 背景高 | 显色液被污染 | 更换显色液 |
| | 显色时间太长 | 控制显色时间 |
| | 反应试剂稀释错误 | 使用推荐稀释方法 |
| | 洗板不彻底 | 足够的洗涤次数和加入足量洗涤液 |

相关产品：

PMK1261 人白介素 2 (IL-2) ELISA 试剂盒
PMK1262 人白介素 4 (IL-4) ELISA 试剂盒
PMK1258 人白介素 6 (IL-6) ELISA 试剂盒
PMK1264 人白介素 8 (IL-8) ELISA 试剂盒

更多产品详情了解，请关注公众号：

