

人白细胞活化黏附因子酶联免疫吸附测定试剂盒

Human ALCAM ELISA Kit

本产品冰袋运输: 保存于 4°C (其中 **标准品** 需保存于 -20°C), 保质期 6 个月; **标准品** 如存放于 4°C, 1~2 周内有效。

货号规格

HJ002 96次

产品特点

- 高灵敏度**——多次重复结果表明, 最小检出量为 37 pg/mL;
- 高特异性**——与人 E-Selectin、ICAM-2、ICAM-3、P-Selectin 及小鼠的 ALCAM 均无交叉反应;
- 重复性好**——板内, 板间变异系数均小于 10%。

产品简介

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法检测样品中人白细胞活化黏附因子的浓度。人 ALCAM 捕获抗体已经预包被于酶标板上, 当加入样品或标准品时, 其中的人 ALCAM 会与捕获抗体结合, 而其它游离成分则会通过洗涤被除去。接着, 再加入生物素化的抗人 ALCAM 抗体后, 抗人 ALCAM 抗体与人 ALCAM 结合, 形成夹心的免疫复合物, 其它游离成分则通过洗涤被除去。随后加入辣根过氧化物酶(HRP) 标记的亲合素, 生物素与亲合素特异性结合, 这样亲合素上标记的 HRP 就与夹心的免疫复合物连接起来, 而其它游离成分则通过洗涤被除去。最后加入显色剂, 若样品中存在人 ALCAM, 则会形成免疫复合物, 其上连接的 HRP 会催化无色的显色剂氧化生成蓝色物质, 而后加入终止液, 最终产物呈黄色。通过酶标仪检测, 读其 450nm 处的 OD 值, 人 ALCAM 浓度与 OD450 值之间呈正比, 通过检测标准品绘制标准曲线, 对照未知样品中 OD 值, 即可计算出样品中人 ALCAM 的浓度。

背景简介

白细胞活化黏附因子(ALCAM)也称 CD166, 属于免疫球蛋白超家族且是 I 型膜糖蛋白。白细胞活化黏附因子具有 570 个氨基酸, 其包含 5 个细胞间免疫球蛋白样结构域, 这些结构域能与自身或其它蛋白(CD6) 结合而使细胞发生相互作用。

白细胞活化黏附因子可由多种细胞产生, 包括: 胸腺内皮细胞、血管内皮细胞、活化的淋巴细胞和单核细胞, 以及单核细胞产生的树突状细胞等。

白细胞活化黏附因子能通过自身及 CD6、NgCAM, 甚至某种脑蛋白的相互结合而发挥作用。白细胞活化黏附因子(ALCAM) 与 CD6 的结合使其在 T 细胞的发育和调控方面扮演着重要的角色。当然, ALCAM 也可与 T 细胞和 B 细胞结合而活化白细胞。最近研究表明, ALCAM 还可使黑色素瘤的转移显著升高, 这提示 ALCAM 可能参与肿瘤转移过程。

产品内容

组分	体积或数量
人ALCAM预包被板	12条
标准品稀释液(5×)	20mL
人ALCAM标准品	≥2支(冻干)
人ALCAM生物素化抗体	10mL
HRP标记的亲合素	10mL
浓缩洗涤液(20×)	30mL
显色剂TMB	10mL
终止液	5mL
封板胶纸	3张

操作步骤

◆ 样品制备

1. 根据样品种类选择相应的处理方法：
 - A. 细胞上清：将细胞培养上清液 100~500×g 离心 5 min，去除悬浮物后即可；
 - B. 血清样品：将全血在室温下静置 0.5~2h，待其自然凝固并析出血清后，离心取黄色上清即可（4℃，1,000~2,000×g，10 min），注意请勿吸取沉淀，制备好的血清需置于冰上待用，请勿在其中添加任何防腐剂或抗凝剂；
 - C. 血浆样品：使用 EDTA 对全血进行抗凝处理后，混合均匀置于冰上，离心取黄色上清即可（4℃，1,000~2,000×g，10 min），注意请勿吸取沉淀，制备好的血浆需置于冰上待用；

注意：① 人血清或血浆样品需稀释后再进行检测；

② 若待测样品无法及时检测，样品制备完成后，请分装冻存于-20℃，避免反复冻融；

③ 请保证待测样品清澈透明，检测前如发现样品中有悬浮物，需通过离心去除；

④ 为了保证检测结果准确，请勿使用溶血、黄疸、高血脂或污染的样品。

◆ 检测准备工作

2. 试剂盒自冰箱取出后，请置于室温平衡 20 min；检测完成后，剩余试剂请及时置于 4℃ 保存；
3. 将 **浓缩洗涤液 (20×)** 用双蒸水或去离子水稀释为 1× 洗涤液；
4. 将 **标准品稀释液 (5×)** 用双蒸水或去离子水稀释为 1× 标准品稀释液；
5. 按标准品标签上注明的复溶体积，用 1× 标准品稀释液复溶使标准品终浓度达到 4,000 pg/mL，室温操作，**请严格控制在 25~28℃**，静置 15~20 min 后轻轻混悬，用移液器吹打数次，使其彻底溶解，然后按下表用 1× 标准品稀释液倍比梯度稀释后依次加入检测孔中。（最高浓度为 4,000 pg/mL，将 1× 标准品稀释液作为浓度 0 pg/mL。）

管号	稀释液用量 (μL)	复溶后标准品用量 (μL)	标准品的最终浓度 (pg/mL)
A	0	250	4,000
B	250	250	2,000
C	250	250 (从 B 管中取)	1,000
D	250	250 (从 C 管中取)	500
E	250	250 (从 D 管中取)	250
F	250	250 (从 E 管中取)	125
G	250	0	0

注意：标准品复溶加样后，剩余部分请丢弃。

◆ 检测流程

6. 通过计算确定一次实验所需的板条数，取出所需板条放置于框架内，多余的板条请放回铝箔袋密封，保存于 4℃；

注意：① 标准品和样品建议做双复孔检测；

② 建议设置本底校正孔，即空白孔，只加入相应体积的 **显色剂 TMB** 和 **终止液** 即可；

③ 每次实验均需绘制标准曲线。

7. 将样品和不同浓度标准品 (100 μL/孔) 分别加入相应孔中，用封板胶纸封住反应孔，室温孵育 120 min。细胞上清样品一般可直接进行检测，如超过试剂盒的检测范围，可用 1× 标准品稀释液进行相应稀释；对于血清或血浆样品，需稀释 60 到 600 倍，如无明确范围，建议用 1× 标准品稀释液从 100

倍开始稀释:

注意: ① 请查阅相关文献确定样品中待检测蛋白的大致浓度, 若其大于或小于本试剂盒的最高或最低标准品浓度, 请将样品适当稀释或浓缩后再进行检测;

② 整个加样过程不宜超过 10min, 否则可能会影响检测结果。

8. 洗板 5 次, 每孔 1×洗涤液用量为 300μL, 注入与吸出间隔 15~30s, 洗完后将板倒扣在厚吸水纸上拍干;

注意: 洗涤过程至关重要, 洗涤不充分会导致结果产生较大误差。

9. 加入 **人 ALCAM 生物素化抗体** (100μL/孔, 无需稀释)。用封板胶纸封住反应孔, 室温孵育 60min;

注意: 检测血清和血浆样品时, 检测抗体的孵育时间应适当延长。

10. 洗板 5 次, 方法同步骤 8;

11. 加入 **HRP 标记的亲合素** (100μL/孔, 无需稀释)。用封板胶纸封住反应孔, 避光室温孵育 20min;

12. 洗板 5 次, 方法同步骤 8;

13. 加入 **显色剂 TMB** (100μL/孔), 避光室温孵育 10~20min;

注意: 在保存和使用时, 请勿将 TMB 接触氧化剂和金属。

14. 加入 **终止液** (50μL/孔), 混匀后即刻使用酶标仪测量 OD450, 同时设定 540nm 或 570nm 作为校正波长, 即可计算得到校正吸光度值 (OD450-OD540 或 OD450-OD570);

注意: 读取 OD 值建议在 10min 内完成。

◆ 数据分析

15. 绘制标准曲线。以标准品浓度作横坐标, OD 值作纵坐标, 利用计算机软件作四参数逻辑 (4-PL) 曲线拟合创建标准曲线, 通过样品的 OD 值即可在标准曲线上计算出其相应浓度。

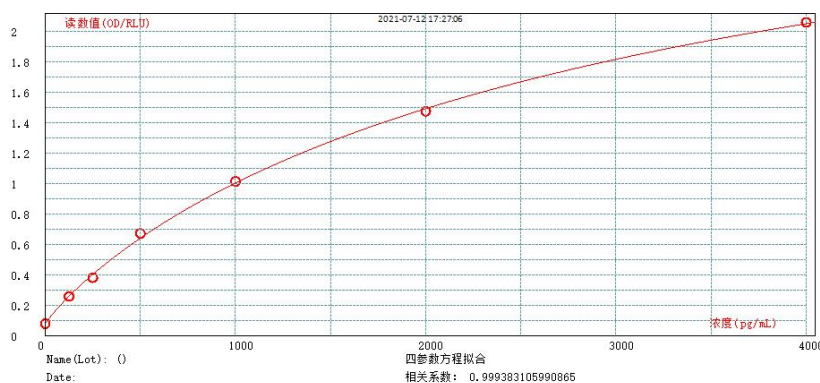
注意: ① 复孔 OD 值在 20% 的差异范围内结果才有效, 复孔 OD 值取平均后可作为测量值;

② 每个标准品或样品的 OD 值应减去本底校正孔的 OD 值;

③ 若样品 OD 值高于标准曲线上限, 应适当稀释后重测, 计算浓度时应乘以稀释倍数。

◆ 标准曲线范例

人白细胞活化黏附因子参考标准曲线



注意: 本图仅供参考, 应以同次试验标准品所绘标准曲线计算样品含量。

注意事项

1. **浓缩洗涤液** 低温情况下可能会出现结晶, 请水浴加热使结晶完全溶解后再配制工作液;
2. 严禁混用不同批号试剂盒的组分;
3. 加样过程请避免产生气泡, 实验操作过程中一定要保证试剂充分混匀, 否则会使结果产生较大误差;
4. 说明书中提到的室温条件, 请严格控制在 25~28℃;
5. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作;
6. 本产品仅限科研使用。

版本号: 21C24