小鼠趋化因子 1(CXCL1)酶联免疫吸附测定试剂盒
Mouse CXCL1 ELISA Kit

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

货号规格

HJ157　　96次

产品特点

- **高灵敏度**——多次重复结果表明，最小检出量为 14 pg/mL；
- **高特异性**——与小鼠 MIP-1α、MIP-1β、MIP-2 及人 CXCL1 均无交叉反应，与大鼠 CINC-1 有 33%交叉反应性；
- **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 法检测样品中小鼠趋化因子 1(CXCL1)的浓度。小鼠 CXCL1 捕获抗体已经预包被于酶标板上，当加入样品或标准品时，其中的小鼠 CXCL1 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小鼠 CXCL1 抗体后，抗小鼠 CXCL1 抗体与小鼠 CXCL1 接合，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，若样品中存在小鼠 CXCL1，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，小鼠 CXCL1 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，即可计算出样品中小鼠 CXCL1 浓度。

背景简介

小鼠趋化因子 1(CXCL1)又名 KC，是属于趋化因子家族的小细胞因子。CXCL1 的 cDNA 编码前体蛋白(96 个氨基酸)，该前体蛋白包括 19 个氨基酸的残基和 77 个氨基酸的成熟肽链。小鼠 CXCL1 的蛋白序列与小鼠 MIP-2 有大约 63%的同源性。小鼠 CXCL1 与人的同源性大约为 60%。CXCL1 蛋白表达广泛，在成纤维细胞、腹水、肺部巨噬细胞、内皮细胞及血管平滑肌细胞均有表达。

细胞分裂素可诱导 CXCL1 的产生，而糖皮质激素能抑制 CXCL1 的产生。CXCL1 和 MIP-2 通过与 IL-8 受体结合启动下游效应，小鼠的 IL-8 受体与人的 IL-8 Rβ及 IL-8 Rα受体同源性分别为 71%和 68%。因为小鼠没有 IL-8 基因，CXCL1 和 MIP-2 就作为 IL-8 的类似物，成为α细胞因子家族中的主角。在各种炎性反应中，提高 CXCL1 的表达会观察到嗜中性粒细胞的集聚。

产品内容

组分	体积或数量
小鼠CXCL1预包被板	12条
样品分析缓冲液	5mL
标准品稀释液(5×)	10mL
小鼠CXCL1标准品	≥2支(冻干)
小鼠CXCL1生物素化抗体	10mL
HRP标记的亲和素	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 0.5~2 h，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 小鼠血清或血浆样品请用 **样品分析缓冲液** 做倍比稀释后再检测；

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 1,000 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 1,000 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	1,000
B	250	250	500
C	250	250（从 B 管中取）	250
D	250	250（从 C 管中取）	125
E	250	250（从 D 管中取）	62.5
F	250	250（从 E 管中取）	31.25
G	250	0	0

注意：标准品复溶加样后，剩余部份请丢弃。

◆ 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 建议设置本底较正孔，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，可先在孔中加入 50 μL **样品分析缓冲液**，接着加入 50 μL 样品，如超出

检测范围，可先加入 50 μL **样品分析缓冲液**，接着加入 50 μL 用 1×标准品稀释液稀释后的样品，再进行检测，请注意记录好样品的稀释倍数；

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 10 min，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 300 μL，注入与吸出间隔 15~30 s，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 **小鼠 CXCL1 生物素化抗体**（100 μL/孔，无需稀释）。用封板胶纸封住反应孔，室温孵育 60 min；

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 标记的亲和素**（100 μL/孔，无需稀释）。用封板胶纸封住反应孔，避光室温孵育 20 min；
12. 洗板 5 次，方法同步骤 8；
13. 加入 **显色剂 TMB**（100 μL/孔），避光室温孵育 10~20 min；

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**（50 μL/孔），混匀后即刻使用酶标仪测量 OD450，同时设定 540 nm 或 570 nm 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 10 min 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。

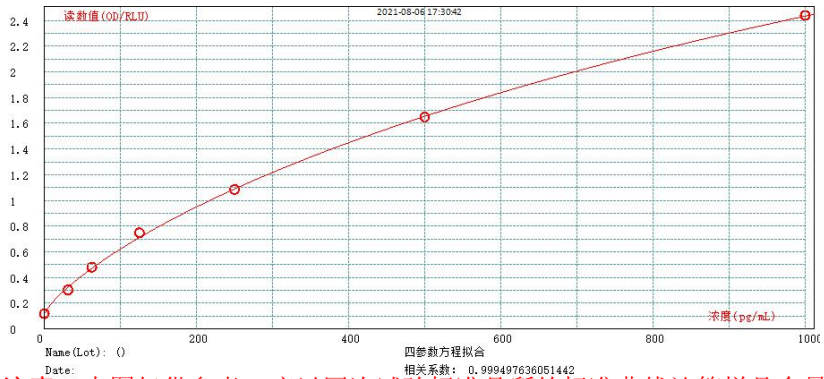
注意：① 复孔 OD 值在 20%的差异范围内结果才有效，复孔 OD 值取平均后可作为测量值；

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

小鼠趋化因子 1（CXCL1）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