

人癌抗原 15-3 酶联免疫吸附测定试剂盒

Human CA15-3 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

HJ014 96 次

产品特点

-  **高灵敏度**——多次重复结果表明, 最小检出量为 0.38 U/mL;
-  **高特异性**——与小鼠 CA15-3、大鼠 CA15-3、马 CA15-3、狗 CA15-3、猫 CA15-3 等均无交叉反应;
-  **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 法检测人来源样品中 CA15-3 的浓度。CA15-3 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 CA15-3 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, 再加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗人 CA15-3 抗体后, 抗人 CA15-3 抗体与 CA15-3 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。最后加入显色剂, 若样品中存在 CA15-3, 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 450 nm 处的 OD 值, CA15-3 浓度与 OD450 值之间呈正比, 通过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 CA15-3 浓度。

背景简介

癌抗原 15-3 (CA15-3) 作为乳腺癌检测中的一种血清标志分子而被广泛使用, 其是 MUC-1 蛋白以可溶性形式在血液中的存在。

CA15-3 (MUC-1) 是一种糖蛋白, 分子量约 400 KD, 其抗原决定簇一部分是糖, 一部分是多肽。在乳腺癌患者的血清中, 30%~50% 的患者可见 CA15-3 明显升高, 有转移灶者增高可达 80%。常用于观察乳腺癌治疗后有无反发及监测乳腺癌的转移。CA15-3 还可与 CA125 联合检查, 用于卵巢癌复发的早期诊断; 与 CEA 联合检测时, 可提高乳腺癌早期诊断的敏感性和特异性。在其它恶性肿瘤如肺癌、卵巢癌、结肠癌、肝癌等, 也可出现血清 CA15-3 增高。

产品内容

组分	体积或数量
人 CA15-3 预包被板	12 条
标准品稀释液 (5×)	10 mL
人 CA15-3 标准品	≥ 2 支 (冻干)
HRP 标记的人 CA15-3 抗体	10 mL
浓缩洗涤液 (20×)	30 mL
显色剂 TMB	10 mL
终止液	5 mL
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 $100\sim 500\times g$ 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°C , $1,000\sim 2,000\times g$, 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°C , $1,000\sim 2,000\times g$, 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 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°C ，避免反复冻融；

② 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；

③ 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°C 保存；
3. 将 **浓缩洗涤液 (20 $\times$)** 用双蒸水或去离子水稀释为 1 $\times$ 洗涤液；
4. 将 **标准品稀释液 (5 $\times$)** 用双蒸水或去离子水稀释为 1 $\times$ 标准品稀释液；
5. 按标准品标签上注明的复溶体积，用 1 $\times$ 标准品稀释液复溶使标准品终浓度达到 50 U/mL，室温操作，**请严格控制**在 $25\sim 28^{\circ}\text{C}$ ，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 $\times$ 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 50 U/mL，将 1 $\times$ 标准品稀释液作为浓度 0 U/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 (U/mL)
A	0	250	50
B	250	250	25
C	250	250 (从 B 管中取)	12.5
D	250	250 (从 C 管中取)	6.25
E	250	250 (从 D 管中取)	3.125
F	250	250 (从 E 管中取)	1.5625
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°C ；

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 (10 μL /孔) 分别加入相应孔中，接着在每孔中补充 90 μL 1 $\times$ 标准品稀释液，用封板胶纸封住反应孔，室温孵育 120 min。如果样品浓度过高，超出检测范围，可在每孔中先加入 90 μL **样品分析缓冲液**，接着加入 10 μL 用 1 $\times$ 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 **10min**, 否则可能会影响检测结果。

8. 洗板 5 次, 每孔 $1 \times$ 洗涤液用量为 $300\mu\text{L}$, 注入与吸出间隔 $15\sim 30\text{s}$, 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 **HRP 标记的人 CA15-3 抗体** ($100\mu\text{L}/\text{孔}$, 无需稀释)。用封板胶纸封住反应孔, 室温孵育 60min ;

10. 洗板 5 次, 方法同步步骤 8;

11. 加入 **显色剂 TMB** ($100\mu\text{L}/\text{孔}$), 避光室温孵育 $10\sim 20\text{min}$;

注意: 在保存和使用时, 请勿将 **TMB** 接触氧化剂和金属。

12. 加入 **终止液** ($50\mu\text{L}/\text{孔}$), 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

13. 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。

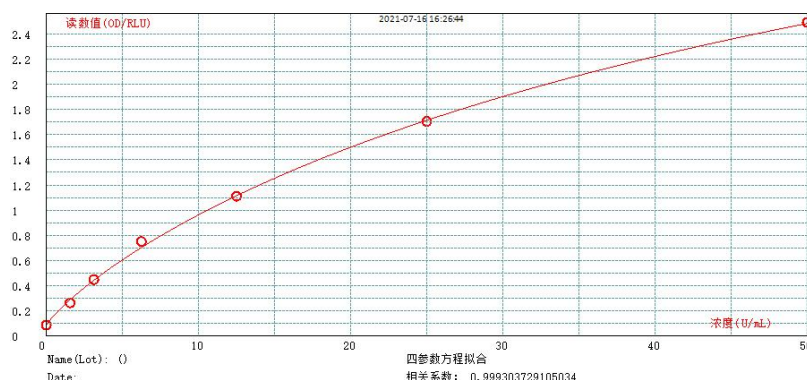
注意: ① 复孔 OD 值在 **20%** 的差异范围内结果才有效, 复孔 OD 值取平均后可作为测量值;

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 CA15-3 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 $25\sim 28^{\circ}\text{C}$;
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