

人细胞毒T淋巴细胞相关抗原4酶联免疫吸附测定试剂盒

Human CTLA-4 ELISA Kit

本产品需冰袋运输。保存于4℃，保质期6个月；保存于-20℃，保质期12个月。

产品参数

货号	HJ411
规格	96 次
检测范围	0.156 ng/mL~10 ng/mL
敏感性	39 pg/mL
特异性	系统和其它因子无交叉反应
样本类型	人血清、血浆、体液、组织匀浆或细胞培养上清

产品简介

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法检测样品中人 CTLA-4 的浓度。人 CTLA-4 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 CTLA-4 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,再加入生物素标记的人 CTLA-4 抗体后,抗人 CTLA-4 抗体与人 CTLA-4 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。随后加入酶复合物,生物素与酶复合物特异性结合,这样酶复合物上的 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 CTLA-4,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,读取 450 nm 处的 OD 值,人 CTLA-4 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 CTLA-4 的浓度。

背景简介

细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 4(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, 简称 CTLA-4)又名 CD152 是激活 T 细胞表达的膜蛋白,对 T 细胞增生起负调节作用,属免疫球蛋白超家族成员,是由 CTLA-4 基因编码的 T 细胞表面跨膜蛋白,其基因定位于 2 号染色体长臂 3 区 3 带(2q33),主要表达于活化的 T 淋巴细胞表面。

CTLA-4 与 CD28 同源,但功能相反。CD28 与其配体 B7-1/2 结合后产生刺激性信号,激活 T 细胞;而 CTLA-4 高表达后会竞争性结合 B7-1/2,抑制白细胞介素 (IL) -2 分泌,从而发挥负性调控作用。CTLA-4 与 B7 分子结合的亲和力比 CD28 更高,因此它可以阻止 CD28 与 B7 分子的结合,进而抑制 T 细胞的激活。CTLA-4 在 Treg 细胞上持续表达,对维持其抑制功能至关重要。Treg 细胞通过 CTLA-4 与 B7 分子结合,耗尽 B7 分子,从而抑制其他 T 细胞的活化。此外,CTLA-4 还能诱导抗原呈递细胞(APC)产生吲哚胺 2,3- 双加氧酶 (IDO),导致色氨酸耗尽,进而抑制 T 细胞的增殖。肿瘤细胞能够激活 CTLA-4,使活化的 T 细胞失去活性,从而实现肿瘤自身的免疫逃逸。

产品内容

组分	体积或数量
人 CTLA-4 预包被板	8 孔条 ×12 个
样品稀释液	30 mL
重组人 CTLA-4 标准品 (冻干)	2 支 (10 ng/ 支)
生物素标记人 CTLA-4 抗体	130 μ L (效价 1:100)
抗体稀释液	12 mL
酶复合物 (HRP 标记的链霉亲和素)	130 μ L (效价 1:100)
酶复合物稀释液	12 mL
浓缩洗涤液 (25 $\times$)	30 mL
显色剂 TMB	10 mL
终止液	10 mL
封板胶纸	4 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 $\times g$ 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 0.5~2 h, 待其自然凝固并析出血清后, 离心取黄色上清即可 (4 $^{\circ}$ C, 1,000~2,000 $\times g$, 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 $^{\circ}$ C, 1,000~2,000 $\times g$, 10 min), 注意请勿吸取沉淀, 制备好的血浆需置于冰上待用；
- D. **组织匀浆/体液**：离心去除沉淀即可。

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 $^{\circ}$ 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。

2. 稀释样品

查阅相关文献, 预估样品中待测因子的含量, 从而确定适当的稀释倍数, 使稀释后样品中待测因子的浓度处于 ELISA 试剂盒的最佳检测范围。根据待测因子含量的不同, 分别采取不同的稀释方案：

- ① 待测因子含量在 100~1,000 ng/mL 范围内, 一般按 1:100 稀释, 即向 297 μ L 样品稀释液中加入 3 μ L 样品；
- ② 待测因子含量在 10~100 ng/mL 范围内, 一般按 1:10 稀释, 即向 225 μ L 样品稀释液中加入 25 μ L 样品；
- ③ 待测因子含量在 0.156~10 ng/mL 范围内, 一般按 1:2 稀释, 即向 100 μ L 样品稀释液中加入 100 μ L 样品；
- ④ 待测因子含量 $\leq$ 0.156 ng/mL, 样品一般无需稀释。

以上方案仅供参考, 实验中请详细记录样品的稀释方法。



检测准备工作

3. 试剂盒自 4℃冰箱取出后,请置于室温平衡 20 min; 如从 -20℃取出,各组分需彻底融化后再平衡 20 min; 检测完成后,剩余试剂请及时置于 4℃或 -20℃保存;
4. 将 浓缩洗涤液(25×) 用双蒸水或去离子水稀释成1×洗涤液;
5. 重组人 CTLA-4 标准品的稀释和使用 (在使用前 2 h 内准备,室温操作,请严格控制在 25~28℃)
- ① 配制 10 ng/mL 标准品: 取 1 mL 样品稀释液加入标准品管内,盖好后静置 15 min 以上,然后反复颠倒 / 搓动以助溶解;
- ② 按下表将 10 ng/mL 标准品用样品稀释液进行倍比梯度稀释。(最高浓度为 10 ng/mL,将标准品稀释液作为浓度 0 ng/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(ng/mL)
A	0	1,000	10
B	300	300(从A管中取)	5
C	300	300(从B管中取)	2.5
D	300	300(从C管中取)	1.25
E	300	300(从D管中取)	0.625
F	300	300(从E管中取)	0.312
G	300	300(从F管中取)	0.156
H	300	0	0

注意: 标准品复溶加样后, 剩余部分请丢弃。

6. 准备生物素标记人 CTLA-4 抗体工作液
- ① 按每孔需添加 100 μL 抗体工作液, 计算其总用量 (为弥补操作中的损耗, 需多配制 100~200 μL);
- ② 按 1 μL 生物素标记人 CTLA-4 抗体 添加 99 μL 抗体稀释液 的比例配制工作液, 轻轻混匀。
7. 准备酶复合物工作液 (需在使用前 1 h 内准备)
- ① 按每孔需添加 100 μL 酶复合物工作液, 计算其总用量 (为弥补操作中的损耗, 需多配制 100~200 μL);
- ② 按 1 μL 酶复合物 添加 99 μL 酶复合物稀释液 的比例配制工作液, 轻轻混匀。

检测流程

8. 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℃或 -20℃;
- 注意: ① 标准品和样品建议做双复孔检测;
- ② 每次实验均需绘制标准曲线。
9. 将用样品稀释液稀释后的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, 37℃孵育 90 min;
- 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, 若其大于本试剂盒标准曲线的最大标准品浓度, 请将样品适当稀释后再进行检测;
- ② 整个加样过程不宜超过 10 min, 否则可能会影响检测结果。
10. 甩去酶标板内液体, 无需洗板, 将板倒扣在吸水纸上拍干;
11. 加入稀释后的生物素标记人 CTLA-4 抗体工作液 (100 μL/ 孔), 用封板胶纸封住反应孔, 37℃孵育 60 min;

12. 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。
13. 加入稀释后的酶复合物 (100 μL / 孔), 用封板胶纸封住反应孔, 37°C 避光孵育 30 min;
14. 洗板 5 次, 方法同步骤 12;
15. 加入 显色剂 TMB (100 μL / 孔), 用封板胶纸封住反应孔, 避光 37°C 反应 10~25 min;
注意: ① 在保存和使用时, 请勿将 TMB 接触氧化剂和金属;
② 因实验室条件差异, 最佳显色时间会有所不同, 反应充分时肉眼可见标准品的前 3~4 孔有明显的梯度蓝色。
16. 加入 终止液 (100 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。

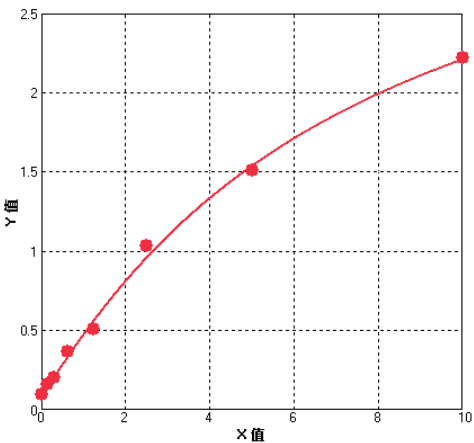
数据分析

17. 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 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 CTLA-4 参考标准曲线

标准品浓度	O.D.
0 ng/mL	0.095
0.156 ng/mL	0.163
0.312 ng/mL	0.201
0.625 ng/mL	0.364
1.25 ng/mL	0.506
2.5 ng/mL	1.030
5 ng/mL	1.508
10 ng/mL	2.219



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°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。