

小鼠肿瘤坏死因子受体超家族成员5酶联免疫试剂盒

Mouse CD40/TNFRSF5 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	HJ348
规格	96次
检测范围	15.62 pg/mL~1,000 pg/mL
敏感性	7 pg/mL
特异性	系统和其它因子无交叉反应
样本类型	小鼠血清、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 法检测样品中小鼠 CD40 的浓度。小鼠 CD40 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 CD40 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小鼠 CD40 抗体后,抗小鼠 CD40 抗体与小鼠 CD40 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,若样品中存在小鼠 CD40,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,小鼠 CD40 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 CD40 的浓度。

背景简介

肿瘤坏死因子受体超家族成员 5(Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 5, 简称 TNFRSF5), 通常被称为 CD40, 是一种在免疫系统中发挥关键作用的蛋白质。CD40 主要表达在专职性抗原提呈细胞(如 B 细胞、树突状细胞和巨噬细胞)表面,同时也是 T 细胞表面 CD40L 分子的天然糖蛋白受体。CD40-CD40L 信号通路的激活参与 T 淋巴细胞活化、抗体类别转换、抗原提呈细胞激活等一系列免疫相关生物学过程。CD40 在连接固有免疫和适应性免疫方面发挥着重要作用,影响肿瘤的发生和发展。

产品内容

组分	体积或数量
小鼠CD40预包被板	8孔条×12个
样品稀释液	30 mL
重组小鼠CD40标准品(冻干)	2支(10 ng/支)
生物素标记小鼠CD40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：

- 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；
- 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；
- 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；
- 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：

- 待测因子含量在10~100 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；
- 待测因子含量在1~10 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；
- 待测因子含量在15.62~1,000 pg/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；
- 待测因子含量 $\leq$ 15.62 pg/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°C 冰箱取出后,请置于室温平衡 20 min; 如从 -20°C 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°C 或 -20°C 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. 重组小鼠 CD40 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°C**)
 - 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 配制 1,000 pg/mL 标准品: 取 100 μ L 10 ng/mL 的标准品加入有 900 μ L 样品稀释液的 EP 管中,混匀,做上标记;
 - ③ 按下表将 1,000 pg/mL 标准品用样品稀释液进行倍比梯度稀释。(最高浓度为 1,000 pg/mL,将标准品稀释液作为浓度 0 pg/mL。)

管号	稀释液用量(μ L)	复溶后标准品用量(μ L)	标准品的最终浓度(pg/mL)
A	0	1,000	1,000
B	300	300(从A管中取)	500
C	300	300(从B管中取)	250
D	300	300(从C管中取)	125
E	300	300(从D管中取)	62.5
F	300	300(从E管中取)	31.25
G	300	300(从F管中取)	15.62
H	300	0	0

注意: 标准品复溶加样后, 剩余部分请丢弃。

6. 准备生物素标记小鼠 CD40 抗体工作液
 - ① 按每孔需添加 100 μ L 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 μ L);
 - ② 按 1 μ L **生物素标记小鼠 CD40 抗体** 添加 99 μ L **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 μ L 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 μ L);
 - ② 按 1 μ L **酶复合物** 添加 99 μ L **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°C 或 -20°C;
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 μ L / 孔) 分别加入相应孔中,用封板胶纸封住反应孔,37°C 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小鼠 CD40 抗体工作液 (100 μ L / 孔),用封板胶纸封住反应孔,37°C 孵育 60 min;

12. 洗板 5 次, 每孔 1× 洗涤液用量为 300 μ L, 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 μ L/ 孔), 用封板胶纸封住反应孔, 37℃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 μ L/ 孔), 用封板胶纸封住反应孔, 避光 37℃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 μ L/ 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。

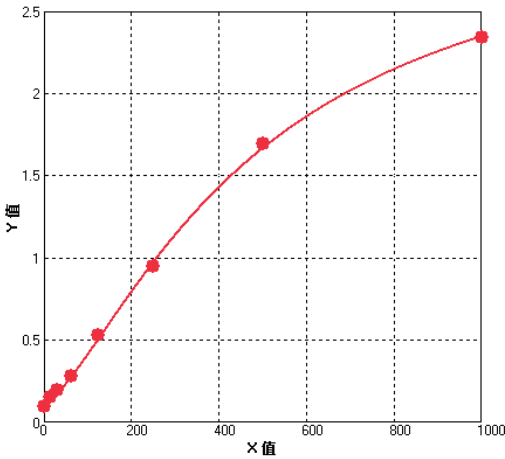
数据分析

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

小鼠CD40参考标准曲线

标准品浓度	O.D.
0 pg/mL	0.098
15.62 pg/mL	0.152
31.25 pg/mL	0.196
62.5 pg/mL	0.283
125 pg/mL	0.527
250 pg/mL	0.951
500 pg/mL	1.693
1,000 pg/mL	2.342



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。