



## 人趋化因子 C-C-基元受体 4 (CCR4) 检测试剂盒

### 使用说明书

#### 人趋化因子 C-C-基元受体 4 (CCR4) 检测试剂盒检测原理：

本试剂盒采用双抗体夹心法：抗人趋化因子 C-C-基元受体 4 (CCR4) 单抗包被于酶标板上，标本和标准品中的趋化因子 C-C-基元受体 4 (CCR4) 会与单抗结合，游离的成份被洗去。加入酶标抗体，抗人趋化因子 C-C-基元受体 4 (CCR4) 抗体与结合在单抗上的人趋化因子 C-C-基元受体 4 (CCR4) 结合而形成免疫复合物，游离的成分被洗去。加入显色底物，若反应孔中有趋化因子 C-C-基元受体 4 (CCR4)，辣根过氧化物酶会使无色的显色剂现蓝色，加终止液变黄。在 450nm 处测 OD 值，趋化因子 C-C-基元受体 4 (CCR4) 浓度与 OD450 值之间呈正比，可通过绘制标准曲线求出标本中的趋化因子 C-C-基元受体 4 (CCR4) 浓度。

选用世界著名生产厂家的原料，采用专业体外诊断试剂生产技术制造。适用于体外定量检测人血清、血浆或细胞培养上清液中天然重组人趋化因子 C-C-基元受体 4 (CCR4) 浓度。仅供科研使用，使用前请仔细阅读说明书并检查试剂组分。

#### 人趋化因子 C-C-基元受体 4 (CCR4) 检测试剂盒组成：

中文名称	英文名称	规格	保存
ELISA 酶标板 (可拆卸)	Micro ELISA Plate(Dismountable)	8×12 / 8×6*	4℃/-20℃ #
冻干标准品	Reference Standard	2/1 支*	4℃/-20℃ #
标准品&样品稀释液	Reference Standard & Sample Diluent	1 瓶 20mL/12mL*	4℃
浓缩生物素化抗体	Concentrated Biotinylated Detection Ab	1 支 120μL/70μL*	4℃/-20℃ #
生物素化抗体稀释液	Biotinylated Detection Ab Diluent	1 瓶 10mL/6mL*	4℃
浓缩 HRP 酶结合物	Concentrated HRP Conjugate	1 支 120μL/70μL*	4℃(避光)
酶结合物稀释液	HRP Conjugate Diluent	1 瓶 10mL/6mL*	4℃
浓缩洗涤液 (25×)	Concentrated Wash Buffer (25×)	1 瓶 30mL/16mL*	4℃
底物溶液(TMB)	Substrate Reagent	1 瓶 10mL/6mL*	4℃(避光)
反应终止液	Stop Solution	1 瓶 10mL/6mL*	4℃
封板覆膜	Plate Sealer	5/3 张*	



产品说明书	Product Description	1 份
质检报告	Certificate of Analysis	1 份
<b>特别说明:</b> *: [96T/48T] (打开包装后请及时检查所有物品是否齐全完整) #: 一周内使用可存于 4℃, 需长时间存放或多次使用建议存于-20℃.		

相关试剂在分装时会比标签上标明的体积稍多一些, 请在使用时量取而非直接倒出!

#### 人趋化因子 C-C-基元受体 4 (CCR4) 检测试剂盒样品收集:

1. 血清: 全血样品于室温放置 2 小时或 4℃ 过夜后于 1000×g 离心 20 分钟, 取上清即可检测, 收集血液的试管应为一次性的无热原, 无内毒素试管。
2. 血浆: 抗凝剂推荐使用 EDTA-Na<sub>2</sub>, 样品采集后 30 分钟内于 1000×g 离心 15 分钟, 取上清即可检测。避免使用溶血, 高血脂样品。
3. 组织匀浆: 用预冷的 PBS (0.01M, pH=7.4) 冲洗组织, 去除残留血液 (匀浆中裂解的红细胞会影响测量结果), 称重后将组织剪碎。将剪碎的组织与对应体积的 PBS (一般按 1:9 的重量体积比, 比如 1g 的组织样品对应 9mL 的 PBS, 具体体积可根据实验需要适当调整, 并做好记录。推荐在 PBS 中加入蛋白酶抑制剂) 加入玻璃匀浆器中, 于冰上充分研磨。为了进一步裂解组织细胞, 可以对匀浆液进行超声破碎, 或反复冻融。最后将匀浆液于 5000×g 离心 5~10 分钟, 取上清检测。
4. 细胞培养上清: 取细胞培养上清于 1000×g 离心 20 分钟, 除去杂质及细胞碎片。取上清检测。
5. 其它生物样品: 1000×g 离心 20 分钟, 取上清即可检测
6. 样品应清澈透明, 悬浮物应离心去除。
7. 样品收集后若在 1 周内进行检测的可保存于 4℃, 若不能及时检测, 请按一次使用量分装, 冻存于-20℃ (1 个月内检测), 或-80℃ (6 个月内检测), 避免反复冻融。
8. 如果您的样品中检测物浓度高于标准品最高值, 请根据实际情况, 做适当倍数稀释 (建议先做预实验, 以确定稀释倍数)。

#### 试验所需自备物品:

1. 酶标仪 (450nm 波长滤光片)
2. 高精度移液器, EP 管及一次性吸头: 0.5-10μL, 2-20μL, 20-200μL, 200-1000μL
3. 37℃ 恒温箱, 双蒸水或去离子水
4. 吸水纸

#### 人趋化因子 C-C-基元受体 4 (CCR4) 检测试剂盒检测前准备工作:

1. 请提前 20 分钟从冰箱中取出试剂盒, 平衡至室温。
2. 将浓缩洗涤液用双蒸水稀释 (1:25)。未用完的放回 4℃。从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶, 属于正常现象, 可用 40℃ 水浴微加热使结晶完全溶解后再配制洗涤液 (加热温度不要超过 50℃, 使用时洗涤液应为室温)。当日使用。



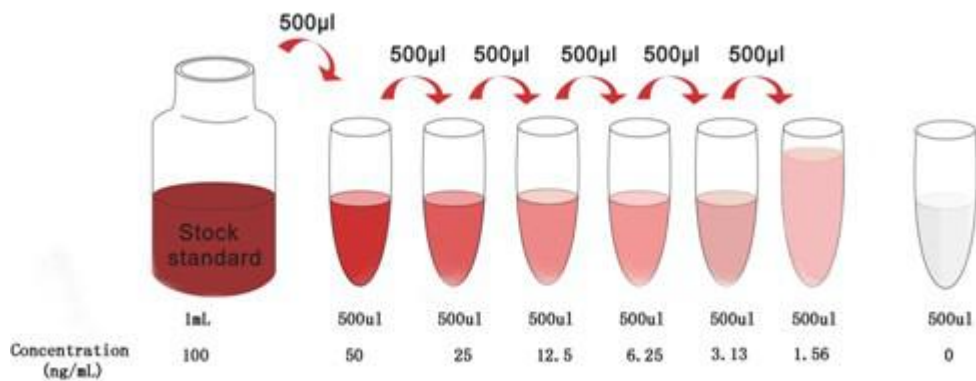
3. 标准品：于  $10000\times g$  离心 1 分钟，加入标准品&样品稀释液 1.0mL 至冻干标准品中，旋紧管盖，静置 10 分钟，上下颠倒数次，待其充分溶解后，用移液器将其轻轻混匀（浓度为 **10ng/mL**。）。然后根据需要进行倍比稀释（注：不要直接在反应孔中进行倍比稀释）。建议配制以下浓度：按照稀释方法图例 标准品&样品稀释液直接作为空白孔 0ng/mL。如配制 5ng/mL 标准品：取 0.5mL 10ng/mL 的上述标准品加入含有 0.5mL 标准品&样品稀释液的 EP 管中，混匀即可，其余浓度依此类推。

4. 生物素化抗体工作液：实验前计算当次实验所需用量（以  $100\mu\text{L}$ /孔计），实际配制时应多配制 100-200 $\mu\text{L}$ 。使用前 15 分钟，以生物素化抗体稀释液稀释浓缩生物素化抗体 (1:100) 成工作浓度。当日使用。

5. 酶结合物工作液：实验前计算当次实验所需用量（以  $100\mu\text{L}$ /孔计），实际配制时应多配制 100-200 $\mu\text{L}$ 。使用前 15 分钟，以酶结合物稀释液稀释浓缩 HRP 酶结合物 (1:100) 成工作浓度。

当日使用。

**标准品稀释方法图例：**（以  $500\mu\text{L}$ /管为例，也可根据实际用量来稀释，如  $200\mu\text{L}$ /管）



#### 洗涤方法：

任何一个成功的 ELISA 检测，正确的洗板方法是非常关键和重要的一方面。连贯的洗板也很有必要的。在稀释浓缩洗涤液时，请使用去离子水或者蒸馏水。

#### ◆ 洗涤瓶或多通道移液器

保证洗瓶内压强良好或者移液器的管头被适当调整并且无碎屑。检查板内的板条是否安好。将板条编号以防在倾泄的时候松动便于调整。首先，倾泄酶标板以清空内容物。根据试剂盒内推荐的体积向每孔内滴加洗液。若实验步骤中要求浸泡，则定时将每孔浸泡完全。将板内液体倾倒完全，用干净纸巾擦拭。按照说明书所示重复以上步骤。最后一次洗板之后，将板内液体倾倒完全，用干净纸巾拍打表面并擦干。切勿让孔内干燥。按照试剂盒内说明书迅速进行下一步实验操作。

#### ◆ 自动洗板仪

将自动洗板仪接入适当真空（根据制造商的说明）。确保每管都被适当抽吸。首先，通过吸或者倾倒将板清空。根据试剂盒内推荐的体积向每孔内滴加洗液。若实验步骤中要求浸泡，则定时将每孔浸泡完全。完全抽吸各孔，保证没有洗液残留。在孔内液体被完全抽走之后不要再将装置至于孔内过分抽吸。按照说明书所示重复以上步骤。最后一次洗板之后，将板内液体倾倒完全，用干净纸巾拍打表面并擦干。切勿让孔内干燥。按照试剂盒内说明书迅速进行下一步实验操作。



#### 操作步骤：

实验开始前，各试剂均应平衡至室温；试剂或样品配制时，均需充分混匀，并尽量避免起泡。

1. 加样：分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。空白孔加标准品&样品稀释液 100 $\mu$ L，余孔分别加标准品或待测样品 100 $\mu$ L，注意不要有气泡，加样时将样品加于酶标板底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀。给酶标板覆膜，37 $^{\circ}$ C 孵育 90 分钟。为保证实验结果有效性，每次实验请使用新的标准品溶液。
2. 弃去液体，甩干，不用洗涤。每个孔中加入生物素化抗体工作液 100 $\mu$ L（在使用前 15 分钟内配制），酶标板加上覆膜，37 $^{\circ}$ C 温育 1 小时。
3. 弃去孔内液体，甩干，洗板 3 次，每次浸泡 1-2 分钟，大约 350 $\mu$ L/每孔，甩干并在吸水纸上轻拍将孔内液体拍干。
4. 每孔加酶结合物工作液（临用前 15 分钟内配制）100 $\mu$ L，加上覆膜，37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟。
5. 弃去孔内液体，甩干，洗板 5 次，方法同步骤 3。
6. 每孔加底物溶液 (TMB) 90 $\mu$ L，酶标板加上覆膜 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 分钟左右（根据实际显色情况酌情缩短或延长，但不可超过 30 分钟。当标准孔出现明显梯度时，即可终止）。
7. 每孔加终止液 50 $\mu$ L，终止反应，此时蓝色立转黄色。终止液的加入顺序应尽量与底物溶液的加入顺序相同。
8. 立即用酶标仪在 450nm 波长测量各孔的光密度（OD 值）。应提前打开酶标仪电源，预热仪器，设置好检测程序。
9. 实验完毕后将未用完的试剂按规定的保存温度放回冰箱保存。

#### 人趋化因子 C-C-基元受体 4 (CCR4) 检测试剂盒注意事项：

- ◆ 仔细阅读说明书。
- ◆ 检查试剂盒标签上的有效期。如果超过有效期，请勿使用。
- ◆ 按说明书确定所有试剂齐全（数量、体积）。
- ◆ 标本制备要规范，每份标本体积要按 2-3 个复孔以上的量制备（贮存），尽量分装做备份。短期内无法实验者，注意低温保存。
- ◆ 准备好所有实验额外所需物品，（比如移液器，试管，清洗器，酶标仪）。
- ◆ 按说明书将所用试剂平衡至室温，根据检测标本数量确定所需试剂的量。
- ◆ 检查试剂盒内每种试剂的贮存条件，保证所有试剂均按照试剂盒内说明书推荐的条件存储。
- ◆ 检查不稳定或者变质的试剂溶液（比如沉淀或变色）。有些试剂，比如标准品稀释液或者检测稀释液，可能在设计时就含有沉淀物。所有试剂在滴入酶标板之前，必需充分混匀。而由于沉淀物的特性，在加入酶标板之前，必需不停搅拌。
- ◆ 保证充分的孵育时间和温度。
- ◆ 切勿使用不同生产批号的试剂取代现有试剂或混合现有试剂。
- ◆ 在混合或溶解蛋白溶液时，避免泡沫产生。
- ◆ 在实验开始之前，安排好实验流程。
- ◆ 在实验开始之前，清洁工作台。



◆ 若有问题，应与我公司或代理商的技术支持联系

#### 结果判断：

1. 每个标准品的 OD 值减去空白孔的 OD 值后作图，如设置复孔，则应取其平均值计算。以标准品的浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，绘出标准曲线。亦可以 OD 值为横坐标，标准品的浓度为纵坐标，绘出标准曲线。
2. 推荐使用专业的曲线制作软件，如 curve expert 1.3 或 1.4，在软件界面既可根据样品 OD 值，由标准曲线查出相应的浓度，乘以稀释倍数；亦可将样品的 OD 值代入标准曲线的拟合方程式，计算出样品浓度，再乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。
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。

#### 人趋化因子 C-C-基元受体 4 (CCR4) 检测试剂盒灵敏度、检测范围、特异性和重复性：

- 灵敏度：最小可测：0.063ng/mL
- 检测范围：0.156-10ng/mL
- 重复性：板内，板间变异系数均<10%。
- 特异性：可检测重组或天然的人趋化因子 C-C-基元受体 4 (CCR4)，且与其它相关蛋白无交叉反应。

#### 操作概要

1. 在各孔中加入标准品或样品各 100 $\mu$ L，37 $^{\circ}$ C 孵育 90 分钟
2. 倒去孔内液体，加入 100 $\mu$ L 生物素化抗体工作液，37 $^{\circ}$ C 孵育 60 分钟
3. 洗涤 3 次
4. 加入 100 $\mu$ L 酶结合物工作液，37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟
5. 洗涤 5 次
6. 加入 90 $\mu$ L 底物溶液，37 $^{\circ}$ C 孵育 15 分钟左右
7. 加入 50 $\mu$ L 终止液，立即在 450nm 波长处测量 OD 值
8. 结果计算

#### 问题分析

若实验效果不好，请及时对显色结果拍照，保留所用板条及未使用试剂，并妥善保存，然后联系我公司技术支持为您解决问题。

我是按照实验步骤进行测定的，但是没有任何信号，为什么？

- ◆ 对于使用 HRP 底物的比色测定，终止液的加入会使底物变色。而说明书推荐的波长就是最适波长。
- ◆ 通过轻拍酶标板的边缘充分混合孔内试剂。加入终止液的时，颜色由蓝变黄（如果是 HRP 底物）。如果加终止液之前孔内试剂没有混合，则底物颜色变绿。
- ◆ 可能加入试剂的顺序错误。
- ◆ 加入底物溶液以后不要清洗酶标板。
- ◆ 在连续稀释时确定已经加入标准品。
- ◆ 如果底物系统中有两个成分，则必需混合均匀。



- ◆ 确定酶标仪的使用和操作正确。
- ◆ 确定试剂，标准品，样品都正确配制并按照说明滴加无误。
- ◆ 对于高敏感性试剂盒，确定使用的底物和放大剂都正确稀释。