人 CD44 酶联免疫吸附测定试剂盒

产品编号：MA1151 规格：96 次

产品内容

产品组成	体积/数量
人 CD44 预包被板	8 孔条×12 个
样品稀释液	30 mL
重组人 CD44 标准品(冻干)	2 支(10 ng/支)
生物素标记人 CD44 抗体	130 μL(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 μL(效价 1:100)
酶复合物稀释液	12 mL
浓缩洗涤液(25×)	30 mL
显色剂 TMB	10 mL
终止液	10 mL
封板胶纸	4 张

产品简介

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法，用于检测样品中人 CD44 的浓度。人 CD44 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 CD44 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 CD44 抗体后，抗人 CD44 抗体与人 CD44 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 CD44，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 CD44 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 CD44 的浓度。

CD44（Pgp-1/Hermes 抗原）是由 11 号染色体单一基因编码的一种分子量 80–200 kDa 的 I 型跨膜糖蛋白，属于免疫球蛋白超家族，其胞外域含 Link 同源结构域负责配体结合，胞内域则连接肌动蛋白骨架参与信号转导；该基因通过选择性剪接产生广泛表达的标准型 CD44s 和主要表达于角质形成细胞、活化淋巴细胞等特定细胞的变异型 CD44v1–v10。作为透明质酸的主要细胞表面受体，CD44 介导细胞与细 胞外基质的粘附、细胞迁移、淋巴细胞归巢及造血过程，同时可结合胶原、骨桥蛋白、生长因子等多种配体，通过招募下游效应分子调控细胞增殖、分化、存活及炎症反应，并在白细胞滚动粘附和外渗中发挥关键作用。临床上，CD44 是公认的肿瘤干细胞表面标志物，在胃癌、胰腺癌、肺癌等多种恶性肿瘤中高表达，与肿瘤侵袭转移、化疗耐药及不良预后密切相关（如 CD44v6 与胰腺癌肝转移相关，CD44 是胃癌术后生 存的独立预后因素），其可溶性形式也被探索作为癌症诊断标志物，而针对 CD44 的抗体、shRNA、适配体及透明质酸修饰纳米载体等靶向治疗策略正处于临床开发阶段。

产品参数：

检测范围	0.156 ng/mL~10 ng/mL
敏感性	30 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

使用方法

（一）样品制备

1.根据样品种类选择相应的处理方法：

（1）细胞上清：将细胞培养上清液100~500×g离心5min，去除悬浮物后即可。

（2）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℃，1,000~2,000×g，10min)，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；

（3）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，10min)，注意请勿吸取沉淀，制备好的血浆需置于冰上待用；

（4）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℃，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 μL 样品稀释液中加入 3 μL 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 μL 样品稀释液中加入25 μL 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 μL 样品稀释液中加入 100 μL 样品；

（4）待测因子含量≤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。

（二）检测准备工作

3.试剂盒自4℃冰箱取出后，请置于室温平衡20min；如从-20℃取出，各组分需彻底融化后再平衡20min；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 CD44 标准品的稀释和使用(在使用前2h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	1000	10
B	300	300(从A管取出)	5
C	300	300(从B管取出)	2.5
D	300	300(从C管取出)	1.25
E	300	300(从D管取出)	0.625
F	300	300(从E管取出)	0.312
G	300	300(从F管取出)	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 CD44 抗体工作液 (需在使用前 1 h 内准备)

（1）按每孔需添加100μL抗体工作液，计算其总用量(为弥补操作中的损耗，需多配制100~200μL)；

（2）按1μL生物素标记人 CD44 抗体添加99μL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。

（三）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(100μL/孔)分别加入相应孔中，用封板胶纸封住反应孔，37℃孵育90min。

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10min，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 CD44 抗体工作液(100μL/孔)，用封板胶纸封住反应孔，37℃孵育60min。

12.洗板5次，每孔1×洗涤液用量为300μL，注入与吸出间隔15~30s，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℃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℃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(100μL/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。

（四）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：

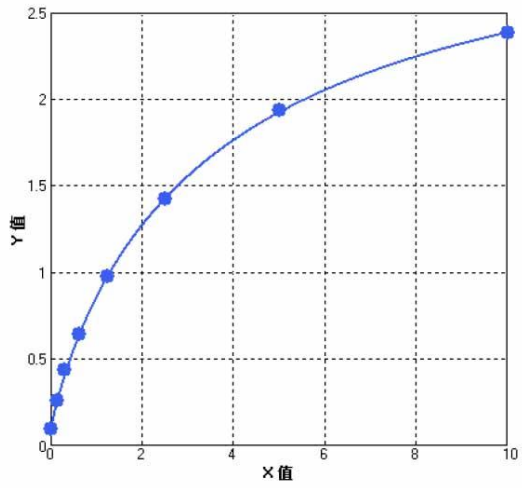
①复孔OD值在20%的差异范围内结果才有效，复孔OD值取平均后可作为测量值；

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 CD44 参考标准曲线

标准品浓度	O.D.
0 ng/mL	0.099
0.156 ng/mL	0.263
0.312 ng/mL	0.439
0.625 ng/mL	0.643
1.25 ng/mL	0.976
2.5 ng/mL	1.425
5 ng/mL	1.939
10 ng/mL	2.381



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。

保存条件

2~8℃保存，自生产之日起6个月有效；长期储存请置于-20℃，自生产之日起12个月有效。

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。

S260901