

# Elisa试剂盒使用说明书

## Human CD14 ELISA Kit

本试剂盒用于体外定量检测人血清、血浆或细胞培养上清液中的CD14浓度。使用前请仔细阅读说明书并检查试剂组分，如有任何疑问请与合肥兰杰柯科技有限公司联系，公司将为您提供强有力的技术支持。



全国统一热线：400-600-4213  
www.biosharp.cn

## 目录

一、产品简介	2
二、检测原理	2
三、试剂盒组分	3
四、储存条件	3
五、注意事项	3
六、实验过程需自备的仪器与材料	3
七、使用说明	4
7.1 样品处理及保存方法	4
7.2 试剂准备	4
7.3 操作步骤	4
7.4 操作要点提示	5
7.5 结果判断	5
八、常见问题分析及解决	6
九、实际加样情况表	7

# Human CD14 (可溶性细胞分化抗原14) ELISA KIT

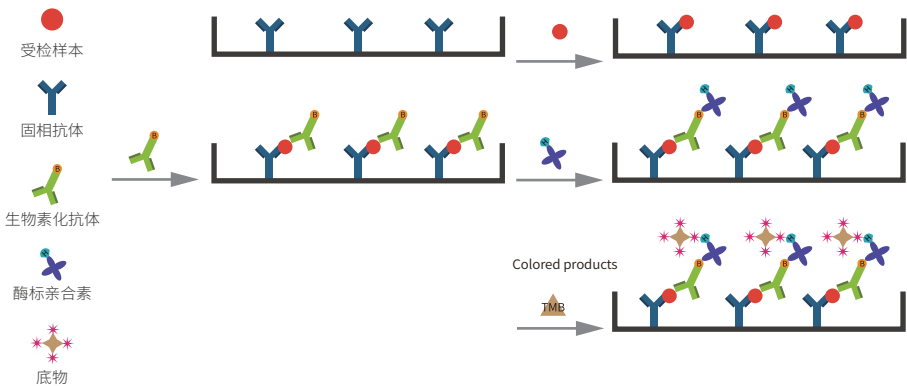
货号	名称	规格
BQEH-501-96T	Human CD14 (可溶性细胞分化抗原14) ELISA KIT	96T

## 一、产品简介

CD14是一种与脂多糖(LPS)结合的模式识别受体,由单核细胞、巨噬细胞及活化的中性粒细胞产生。CD14是单核/粒细胞分化抗原中一种糖蛋白,以两种不同形式存在:55 KDa的GPI膜锚定CD14 (mCD14)和48 KDa的肝脏来源的血清可溶性CD14。sCD14是一种急性期蛋白,在败血症期间显著上调,但在正常的微克浓度血清中也能发现。CD14在凋亡细胞的吞噬清除以及格兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌微生物细胞壁组分的活化和免疫识别中发挥重要作用。sCD14可以将LPS转移到TLR4/MD-2复合物中,引发炎症信号和TLR4内吞的级联反应,介导不同免疫应答过程中细胞间的联系以及介导凋亡细胞的识别等有关生理活动。

## 二、检测原理

本实验采用双抗体夹心ELISA法检测样本中CD14的浓度。用抗人CD14单克隆抗体预包被酶标板,加入适度稀释的样本和标准品,其中的CD14会与其单抗结合,洗去游离成分;加入生物素化的抗人CD14抗体,抗人CD14抗体与结合在单抗上的人CD14结合而形成免疫复合物,洗去游离的成分;加入辣根过氧化物酶标记的亲合素,生物素与亲合素特异性结合,洗去未结合的酶结合物;加入显色剂,若反应孔中有CD14,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下测OD值,CD14浓度与OD<sub>450</sub>值之间呈正比,可通过绘制标准曲线计算出标本中CD14浓度。



### 三、试剂盒组成

组分编号	组分	96t	储存条件
BQEH-501-1	<b>人CD14标准品</b>	<b>≥2支(冻干)</b>	<b>-20°C</b>
BQEH-501-2	人CD14预包被板	12条	2-8°C
BQEH-501-3	5×标准品稀释液	20mL	2-8°C
BQEH-501-4	CD14生物素化抗体	10mL	2-8°C
BQEH-501-5	亲和素连接的HRP酶	10mL	2-8°C
BQEH-501-6	浓缩洗涤液 20×	30mL	2-8°C
BQEH-501-7	TMB底物	10mL	2-8°C
BQEH-501-8	终止液	5mL	2-8°C
BQEH-501-9	封板胶纸	3张	2-8°C
	说明书	1份	

### 四、储存条件

产品收到后如果不立即使用,请根据提示将不同的组分放到对应的储存条件储存(冻干标准品-20°C保存,其它组分2-8°C保存)。试剂盒有效期6个月,酶标板拆开后建议一个月内使用完毕。

### 五、注意事项

- 1、试剂盒保存在2-8°C,除复溶后的标准品,其它成分不可冷冻。
- 2、由于标准品一般是冻干粉,在制备后需要严格校准,所以标准品的瓶数及每瓶标准品所需加入的稀释液体积请以实际收到的试剂盒及标准品标签上的标注为准。
- 3、浓缩洗涤液因在低温下可能有结晶,请水浴加热使结晶完全溶解后再配制工作液。
- 4、标准品复溶加样后,为了确保标准品使用的准确性,如有剩余请丢弃避免再次使用。
- 5、TMB溶液请勿接触氧化剂和金属,避免失效。
- 6、不同批号试剂不可混用。
- 7、为避免交叉污染请使用一次性吸头。
- 8、洗涤过程是至关重要的,洗涤不充分会使精确度下降并导致结果误差较大,请严格按照说明书的洗涤次数和浸泡时间进行洗涤(机器洗板按设定的程序洗板,人工洗板浸泡时间可适当延长)。
- 9、在试验中标准品和样本检测时建议作双复孔或三复孔,加入试剂的顺序应一致,以保证所有反应孔孵育的时间一样。
- 10、加样过程中避免气泡的产生。
- 11、本产品仅限于专业人员的科学研究用,不得用于临床诊断或治疗,不得用于食品或药品,不得存放于普通住宅内。
- 12、为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作。

### 六、实验过程需自备的仪器与材料

- 1、酶标仪(450nm)
- 2、高精度可调移液器及吸头:0.5-10, 2-20, 20-200, 200-1000μL;一次检测样品较多时,最好用多通道移液器
- 3、自动洗板机或洗瓶
- 4、双蒸水或去离子水

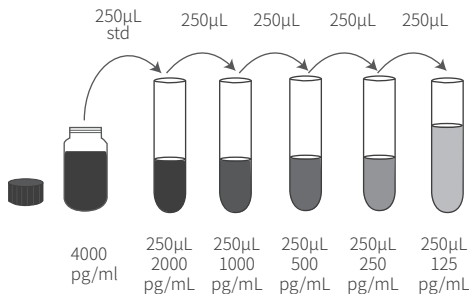
## 七、使用说明

### 7.1 样本处理及保存方法

- 1.血清:血清样本应是自然凝固后,取上清,样本收集时,请注意不同样本凝血时间尽可能保持一致。
- 2.血浆:血浆样本收集时,如果不能及时离心,需添加抗凝剂,建议尽量用EDTA抗凝剂。
- 3.细胞上清液:1000×g离心10min去除颗粒和聚合物。
- 4.保存:若样品不立即检测,请将其按一次用量分装,-20℃~-70℃保存,避免反复冻融。尽量避免使用溶血或高血脂样本。如果血清中含有大量颗粒,检测前先离心或过滤去除;室温下解冻,请勿于37℃或更高的温度加热解冻。
- 5.请勿使用溶血,高血脂或污染的标本检测,否则结果将不准确
- 6.稀释:可根据实际情况,将样本做适当倍数稀释(建议做预实验,以确定稀释倍数)。  
注:人血清或血浆样本请用标准品稀释液稀释后再检测。

### 7.2 试剂准备

- 1.提前30min从冰箱中取出试剂盒,平衡至室温(25~28℃)。
- 2.洗涤缓冲液:从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶,这属于正常现象,加热并轻轻摇晃使结晶完全溶解后再配制。将浓缩洗涤液用双蒸水稀释(1:20)。未用完的放回4℃。
- 3.如有5X标准品稀释液,请按所需量用双蒸水或去离子水稀释(1份加4水)。
- 4.标准品:加按标签复溶体积加入1X标准品稀释液复溶使CD14终浓度达到4000pg/mL,室温反应,请严格控制在25~28℃,静置10~15分钟后轻轻混悬(建议抽吸几次)待彻底溶解,用标准品稀释液倍比梯度稀释后依次加入检测孔中,见下图(建议标准曲线使用以下浓度:4000、2000、1000、500、250、125.0pg/mL,标准品稀释液直接加入检测孔中作为0浓度)。稀释的标准品不得重复使用。



标准品稀释方法

注意:标准品复溶加样后,剩余部分请丢弃。

### 7.3 操作步骤

- 1.按照上述准备工作配制好各种溶液。
- 2.根据待测样品数量和标准品的数量决定所需的板条数,并增加1孔作为空白对照孔,设置方法为该孔只加TMB显色液和中止液。
- 3.分别将样品和不同浓度标准品(100µL/孔)加入相应孔中(零孔只加标准品稀释液),用封板胶纸封住反应孔,25-28℃孵箱孵育120分钟(空白对照孔除外)。对于血清或血浆样品的CD14的检测,不同样品稀释比例有所不同,一般范围在300-30000倍,如无明确范围,建议用1×标准品稀释液从500倍开始稀释。对于细胞上清液样品的CD14的检测,一般建议用1×标准品稀释液稀释5倍后检测。如果样本浓度过高,超过检测范围,请加大稀释倍数后重新稀释检测。请注意记录好样本的稀释倍数。

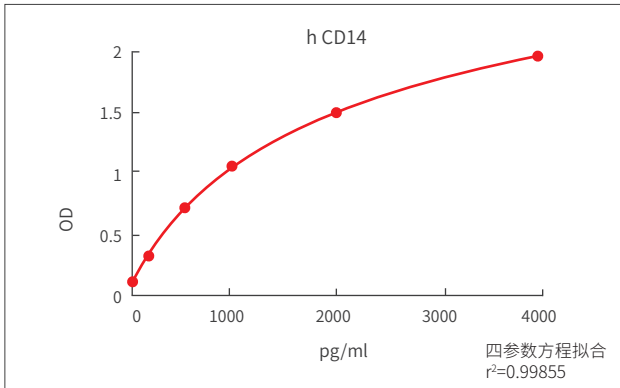
- 4.洗板5次:(1)自动洗板机:要求注入的洗涤液为每孔300 $\mu$ L,注入与吸出间隔15-30秒。(2)手工洗板:甩尽孔内液体,每孔加洗涤液300 $\mu$ L,静置30秒后甩尽液体。最后一次洗板完成后将板倒扣在厚吸水纸上拍干。
- 5.加入生物素化抗体工作液(100 $\mu$ L/孔)。用封板胶纸封住反应孔,室温(25-28 $^{\circ}$ C)孵育60分钟(空白对照孔除外)。
- 6.洗板5次,且最后一次置厚吸水纸上拍干。
- 7.加入亲和素连接的HRP酶工作液(100 $\mu$ L/孔)。用封板胶纸封住反应孔,避光室温(25-28 $^{\circ}$ C)孵育20分钟(空白对照孔除外)。
- 8.洗板5次,且最后一次置厚吸水纸上拍干。
- 9.加入显色剂TMB 100 $\mu$ L/孔,避光,室温(25-28 $^{\circ}$ C)孵育15-20分钟。
- 10.加入终止液50 $\mu$ L/孔,混匀后即刻测量OD<sub>450</sub>值。

## 7.4 操作要点提示

- 1.配制各种试剂时要充分混匀,但要避免产生大量泡沫,以免加样时加入大量的气泡,产生加样误差。
- 2.为避免交叉污染,在加入不同浓度的标准品、不同样品、不同试剂时谨记及时更换吸头。
- 3.为了确保准确的结果,在每次孵育前均需使用新封板胶纸封住反应孔。
- 4.显色剂在添加之前,应保持无色,请勿使用已变为蓝色的显色溶液。最佳显色时间对标准曲线很重要,肉眼可见前3-4孔有梯度蓝色,后3-4孔差别不明显,零孔无蓝色出现即可终止。
- 5.每次检测均要做标准曲线,根据样品待测因子的含量,适当稀释或浓缩样本,最好做预实验。

## 7.5 结果判断

- 1.如果做了空白对照组,将每个孔的OD值减去空白孔的OD值,复孔的值在20%的差异范围内结果才有意义。
- 2.可根据使用习惯及实验室建立的模型,使用计算机软件计算相应的样本浓度。也可用EXCEL软件,标准曲线将OD值放X轴,浓度放Y轴,拟合曲线,计算样本结果。
- 3.若标本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算标本含量。
- 4.参考数据:



注:本图仅供参考,应以同次试验标准品所绘标准曲线为准。

### 结果重复性:

板间,板内变异系数均<10%。

### 灵敏度:

最低检测人CD14剂量小于29pg/mL。最低检出量测定方法:20个零标准的平均OD值增加两个标准差,再计算相应的浓度。

### 特异性:

与人的GM-CSF、IL-4、TNF- $\alpha$ 及小鼠的CD14、IL-13无交叉反应性。

## 八、常见问题分析及解决

问题	可能原因	解决办法	
无颜色	不同试剂盒或不同批号的试剂混合	重新检查试剂的标签, 确保所有组分都属于正使用的试剂盒中的。不能混用不同试剂盒或不同批号的试剂。	
	漏加酶	检查操作流程, 注意不要漏加	
	HRP酶污染了叠氮钠 试剂配制/使用有误	使用新配制的试剂, 禁止叠氮钠 重做试验, 严格按说明书操作, 每次配制和使用前看清标签	
显色弱	超过有效期的产品可能会产生很弱的信号	检查产品有效期	
	缩短孵育时间能使实验信号变弱	检查孵育时间	
	使用了被污染的试剂	检查试剂是否被污染	
	仪器设定不正确, 滤光片不匹配	仪器是否设定正确。滤光片的使用等	
	洗涤操作不规范	洗涤不充分, 使用手工洗板常出现	洗瓶洗涤, 每孔应完全充满洗涤缓冲液, 倾出时应迅速
			若用洗板机, 应校准并设定足够充满每孔的体积量。板内侧不应接触设备
		检查每孔是否有残留的液或每孔加样量的体积是否准确	
		可在两次洗板之间加30秒的浸泡	
高背景	实验中孵育温度和时间不适当	确定每一试验步骤的孵育温度和时间是否适当	
	酶加量过多	加酶前检查移液器调节量是否准确 检查稀释度, 必要时进行效价测定	
全部板子变成规则的蓝色	不充分的洗涤/洗涤步骤被遗漏使没结合的HRP仍有残留	最好使用洗板机充分洗涤 检查每孔是否有残留的液或加样量是否准确	
	太多的酶结合物	检查稀释度, 必要时进行效价测定	
	封板膜或试剂容器被重复使用, 导致HRP残留, 使TMB底物产生非特异显色	使用新封板膜, 每步使用不同的试剂容器	
高CV值花板	操作不慎或洗涤不充分	按说明书洗板、加样和显色, 洗板尤为重要	
	出现干板, 没有使用封板膜、封板膜重复使用	确定每两步骤间酶标板应保持湿润 使用封板膜封口, 注意每步使用新鲜的封板膜	
	移液器不准确, 吸头重复使用	检查并校准移液器, 每次取样必须更换吸头	
	酶结合物不足	检查稀释度, 必要时进行效价测定	
标准曲线可得到, 但两点之间区别很差 (低或平的曲线)	检测抗体不足	检查稀释度, 必要时进行效价测定	
	板子显色不足	延长底物孵育时间 使用推荐品牌的底物溶液	
		使用内参对照	
标准曲线很好, 但没有任何期望的阳性信号	标本中无相应的待检测物质	重复实验, 重新考虑实验的相应参数	
	标本基质遮盖检测	将标本至少做1:2相应的稀释, 或进行系列稀释	
标准曲线很好, 但标本的判读值很高	标本中含的特检物质水平超过实验范围	稀释标本	
边缘效应	工作环境温度不均衡	避免将板子在变化温度环境中孵育	
	实验过程中出现间断	整个实验应连续操作, 在实验开始前将所有的标准品和标本做适当的准备。	
	试剂没有按说明书平衡至室温	在所有试剂加入孔前, 确保它们已平衡至室温, 除非说明书中有另外的要求。	
漂移	是否可更改试剂盒所提供的操作步骤?	一般厂商为确保最高的灵敏度, 对试剂盒都进行了优化, 为确保每一试剂盒实验的规范性应按说明书操作。	
	是否可混用不同批次试剂盒中的试剂?	不可以, 绝大多数试剂在每批试剂盒中是特异的, 若有问题可与厂家或代理商联系。	
	是否可增加或减少标本的体积?	商品化的试剂盒所需加入的标本体积是优化的, 应按说明书操作, 不建议更改所加标本体积。	
	是否可重新确定自己的标准曲线的点?	可以, 说明书上有建议制备标准曲线时标准品的稀释度, 可改变稀释倍数和增加曲线的点, 但是必须在实验范围内, 高于试剂盒中最高标准品的点和低于灵敏度以下的点是无效的。	

