

仅供科研使用，不得用于临床诊断

大鼠封闭蛋白 3 (CLDN3) 定量检测试剂盒 (ELISA)

定量检测血清、血浆、细胞培养上清液中大鼠封闭蛋白 3 (CLDN3) 的浓度。

使用试剂盒前，必须仔细阅读本说明书。

实验原理

本试剂盒采用双抗体夹心酶联免疫吸附试验（ELISA）。在预包被抗大鼠封闭蛋白 3（CLDN3）抗体（固相抗体）的微孔酶标板中，加入大鼠封闭蛋白 3（CLDN3）校准品和待测样本，再加入另一株 HRP 标记的抗大鼠封闭蛋白 3（CLDN3）抗体（酶标抗体），经过温育与充分洗涤，去除未结合的组分，在微孔板固相表面形成固相抗体-抗原-酶标抗体的夹心复合物。加底物 A 和 B，底物在 HRP 催化下，产生蓝色产物，在终止液（2M 硫酸）作用下，最终转化为黄色，在酶标仪 450nm 波长上测定吸光度（OD 值），吸光度（OD 值）与待测样品中大鼠封闭蛋白 3（CLDN3）的浓度正相关。拟合校准品曲线，可以计算出样本中大鼠封闭蛋白 3（CLDN3）的浓度。

试剂盒限制性

- 1、仅供科研使用，不得用于临床诊断。
- 2、在试剂盒标示的有效期内使用，过期产品不得使用。
- 3、跟其他厂家的试剂盒或者组分不能混用。
- 4、使用试剂盒配套的样品稀释液。
- 5、如果样本值高于最高标准品浓度值，请将样本适当稀释后，再重新测定。
- 6、待测样本中存在的人抗鼠等异嗜抗体会干扰检测结果，检测前，请排除该因素。
- 7、通过其他方法得到的检测结果，与本试剂盒测定结果不具有直接的可比性。

技术提示

- 1、混合蛋白溶液时，避免起泡。
- 2、加校准品与样本时，每个校准品浓度和样本都要更换移液枪头，公共组分应该悬臂加样，避免交叉污染。
- 3、合适的温育时间，和充分的洗涤步骤，是保证实验结果准确性的必要条件。
- 4、使用自动洗板机时，加入一个 30 秒浸泡的步骤，可以提高检测精度。
- 5、底物溶液为无色液体，保存过程中变为蓝色，代表底物溶液已经失效，不得使用。
- 6、终止液加样顺序与底物溶液加样顺序一致，加入终止液后，蓝色底物产物，会瞬间变为黄色。
- 7、实验中，用剩的板条，应立即放回自封袋中，密封（低温干燥）保存。
- 8、所有液体组分，使用前充分摇匀，严格按照说明书标明的时间、加样量及加样顺序进行温育操作。

试剂盒组分与保存

未开封的试剂盒保存在 2-8 度，不得使用过期试剂盒。

组分	数量	主要成分	开封后储存
校准品	0.3ml/管	--	2-8℃14 天
包被微孔板	96T/48T	预包被固相抗体	2-8℃14 天
HRP 标记抗体	10mL	HRP 标记的检测抗体	2-8℃180 天
样本稀释液	6mL	--	2-8℃180 天
底物液 A	6mL	0.01%过氧化氢	2-8℃180 天
底物液 B	6mL	0.1%TMB	2-8℃180 天
终止液	6mL	2mol/L 稀硫酸	2-8℃180 天
20×浓缩洗涤液	25mL	0.05%Tween20	2-8℃180 天
说明书	1 份	--	--
自封袋	1 个	--	--
不干胶	2 片	--	--

校准品浓度依次为：600、300、150、75、37.5、18.75 pg/mL。

其他用品

- 1、酶标仪（450nm）
- 2、精密移液器及一次性吸头
- 3、蒸馏水
- 4、洗瓶或者自动洗板机
- 5、37℃水浴锅或恒温箱
- 6、500ml 量筒

生物安全

- 1、检测必须符合实验室管理规范的规定，严格防止交叉污染，所有样品、洗弃液和各种废弃物都应按照传染物进行处置。
- 2、试剂盒的液体组分中，含有 proclin-300 防腐剂，可能引起皮肤过敏反应，避免吸入烟雾与皮肤接触。
- 3、底物液对皮肤、眼睛和上呼吸道有刺激作用，避免吸入烟雾。
- 4、戴上防护手套，实验完成后彻底洗手。

仅供科研使用，不得用于临床诊断。

样品的采集和储存

以下只是列出样品采集和保存的一般指南。所有样本采集保存过程中，不得使用叠氮钠做为防腐剂。

- 1、**细胞培养上清**：4000rpm 条件下离心 20min，去除细胞颗粒和聚合物，上清液保存在-20℃ 以下，避免反复冻融。
- 2、**血清**：使用不含热原和内毒素的试管，操作过程中避免任何细胞刺激，4000rpm 条件下离心 20min，小心地分离出血清，保存在-20℃ 以下，避免反复冻融。
- 3、**血浆**：肝素，EDTA，或柠檬酸钠作为抗凝剂。在 4000rpm 条件下，离心 20 分钟取上清，血浆保存在-20℃ 以下，避免反复冻融。

样本收集后，无法一次检测完毕，请按一次用量分装冻存，避免反复冻融，使用时在室温下解冻，确保样品均匀充分解冻。

- 4、**组织匀浆**：用预冷的 PBS (0.01 M, pH=7.4) 冲洗组织，去除残留血液，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 9 mL 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，在冰上充分研磨。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 5000×g 离心 5-10 分钟，取上清检测。
- 5、**细胞提取液**：贴壁细胞用冷的 PBS 轻轻清洗，然后用胰蛋白酶消化，1000×g 离心 5 分钟后收集细胞；悬浮细胞可直接离心收集。收集的细胞用冷的 PBS 洗涤 3 次。每 1×10^6 个细胞中加入 150-200 μ LPBS 重悬并通过反复冻融使细胞破碎(若含量很低可减少 PBS 的体积)。将提取液于 1500×g 离心 10 分钟，取上清检测。
- 6、**其他生物体液**：1000×g 离心 20 分钟，除去杂质及细胞碎片。取上清检测。

试剂准备

- 1、使用前，所有的组分都要至少复温 120min，确保充分复温到室温。
- 2、**浓缩洗涤液**：从冰箱取出的浓缩洗涤液，会有结晶产生，这属于正常现象，水浴加热使结晶完全溶解。浓缩洗涤液与蒸馏水，按 1:20 稀释，即 1 份的浓缩洗涤液，添加 19 份的蒸馏水。
- 3、**底物**：底物液 A 和 B，在使用前，按 1:1 体积充分混合，混合后 15 分钟内使用。

操作程序

所有试剂和组分都先恢复到室温，标准品、质控品和样品，建议做复孔。

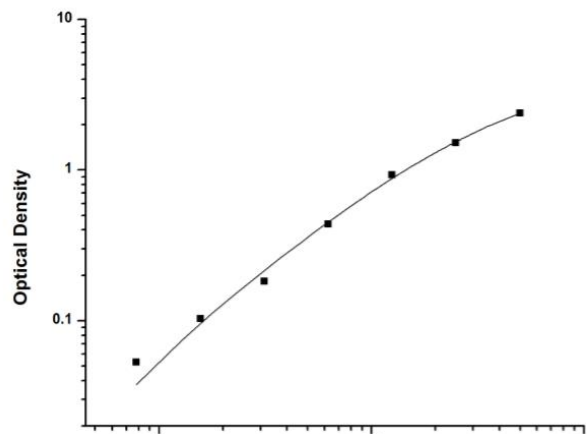
- 1、按前面说明书描述的方法，配制好试剂盒各种组分的工作液。
- 2、从铝箔袋中取出所需板条，剩余的板条用自封袋密封放回冰箱。

设置标准品孔、0 值孔、空白孔和样本孔，标准品孔各加不同浓度的标准品 50 μ L，0 值孔加样本稀释液 50 μ L，空白孔不加，样本孔加待测样本 50 μ L。

- 3、除空白孔外，标准品孔、0 值孔和样本孔，加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的检测抗体 100 μ L。
- 4、用封板膜盖住反应板，37 $^{\circ}$ C 水浴锅或恒温箱避光温育 60min。
- 5、揭开封板膜，弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液，静置 20S，甩去洗涤液，吸水纸上拍干，如此重复 5 次。若使用自动洗板机，请按洗板机操作程序进行洗板，添加浸泡 30s 的程序，可以提高检测的精度。洗板结束，加底物前，要在干净不掉屑的纸上，充分拍干反应板。
- 6、将底物 A 和 B 按 1:1 体积充分混合，所有孔中加入底物混合液 100 μ L。用封板膜盖住反应板，37 $^{\circ}$ C 水浴锅或恒温箱避光温育 15min。
- 7、所有孔加入终止液 50 μ L，在酶标仪上读取各孔吸光度（OD 值）。

结果计算

- 1、以标准品浓度做为横坐标（6 个标准品孔，加 1 个 0 值孔，共 7 个浓度点），对应的吸光度（OD 值）作为纵坐标，利用计算机软件，采用四参数 Logistic 曲线拟合（4-p1），创建标准曲线方程，通过样品的吸光度（OD 值），利用方程计算样品的浓度值。
- 2、如果样品被稀释，通过上述方法测的浓度值，要乘以稀释倍数，才是样品的最终浓度。



(示意图, 仅供参考)

试剂盒性能指标

1、物理性能

试剂盒的各液体组分应澄清透明、无沉淀或者絮状物。微孔板铝箔袋应真空包装，无破损漏气。

2、剂量反应曲线线性

校准品剂量反应曲线相关系数 r 值，大于等于 0.9900。

3、精密度

批内精密度：三组已知的高、中、低浓度样品，进行二十次在同一个板块内精度评估。批内变异系数 CV% 小于 10%。

批间精密度：三组已知的高、中、低浓度样品，进行二十次在不同板块内精度评估。批间变异系数 CV% 小于 15%。

4、灵敏度

最低检出剂量小于 1.0 pg/mL。

5、回收率

三组已知的高、中、低浓度样品，进行五次在同一个板块内回收率评估，回收率在 85%-115% 之间。

6、特异性

本试剂盒识别天然和重组大鼠封闭蛋白 3 (CLDN3)，与结构类似物无交叉。

7、稳定性

2°C-8°C 保存，有效期 6 个月。

8、检测范围

18.75 pg/mL - 600 pg/mL。