

**Human CD40 ligand ELISA Kit**

**人 CD40 配体检测试剂盒**

**Cat#97011ES**

**使用说明书**

Product Manual



## Human CD40 ligand ELISA Kit

### 人 CD40 配体检测试剂盒

#### 产品信息

产品名称	产品编号	规格
Human CD40 ligand ELISA Kit	97011ES48	48T
	97011ES96	96T

- 检测范围：15.6-1000 pg/mL
- 检测方法：双抗夹心法
- 检测物种：人
- 检测时长：4 小时 50 分钟
- 灵敏度：0.557 pg/mL
- 稀释线性：76 - 125%
- 回收率：88 - 125%
- 板内差：4.1%
- 板间差：3.5%

#### 使用说明：

用于定量检测血清、血浆、细胞培养上清中人 CD40 配体（Human CD40 ligand）含量。

使用本品前，请仔细阅读说明书。

本产品仅用于研究，不能用于临床诊断或治疗。

## 目 录

一、研究背景 .....	3
二、产品描述 .....	3
三、试剂盒组分 .....	4
四、运输与保存方法 .....	4
五、注意事项 .....	4
六、常见技术提示 .....	5
七、其他准备材料 .....	5
八、实验前准备 .....	5
九、实验方法 .....	6
十、标曲制定 .....	7
十一、实验数据 .....	7
十二、检测简图 .....	10
十三、疑问解答 .....	10

## 一、研究背景

CD40 配体，也称为 TNFSF5、CD154、TRAP 和 gp39，是一种以跨膜和可溶形式表达的三聚体蛋白。它由许多免疫细胞类型以及血管内皮和平滑肌细胞表达。它与抗原呈递细胞、血小板、内皮细胞和上皮细胞上的 CD40 结合，导致 B 细胞活化和 T 细胞依赖性体液免疫反应增强。CD40 配体失调导致艾滋病、动脉粥样硬化、动脉粥样硬化血栓形成和再狭窄的免疫病理。

## 二、产品描述

翌圣 Human CD40 ligand ELISA(酶联免疫吸附测定)试剂盒是一种体外酶联免疫吸附测定试剂盒，用于定量测定血清、血浆和细胞培养上清中的人 CD40 配体(Human CD40 ligand)。特异性抗人 CD40 配体抗体预包被在高亲和力的酶标板上。酶标板孔中加入标准品、待测样本，经过孵育，样本中存在的人 CD40 配体与固相抗体结合。洗涤去除未结合的物质后，加入检测抗体(生物素标记)孵育结合，经洗涤，再加入酶结合物(HRP 标记链霉亲和素)孵育结合。洗涤后，加入显色底物 TMB，避光显色。颜色反应的深浅与样本中人 CD40 配体的浓度成正比。加入终止液终止反应，在 450 nm 主波长，570nm 次波长测定吸光度值。

### 三、试剂盒组分

表 1. 试剂盒组分表

编号	组分名称	规格 (48T)	规格 (96T)	储存温度
97011-A	预包被酶标板	48 T	96 T	4°C
97011-B	标准品	1ng	2ng	4°C
97011-C	检测抗体	450ng	900ng	4°C
97011-D	酶结合物	35 μL	70 μL	4°C (避光)
97011-E	5×样品/抗体/酶稀释液	8 mL	14 mL	4°C
97011-F	20×洗液	25 mL	50 mL	4°C
97011-G	底物液	8 mL	15 mL	4°C (避光)
97011-H	终止液	5 mL	10 mL	常温
97011-I	封板膜	3 片	5 片	常温

### 四、运输与保存方法

试剂盒可全置于 4°C 贮存，稀释成工作浓度试剂即用即弃，不可重复使用。

表 2. 首次使用后试剂保存表

物料名称	保存条件
预包被酶标板	未使用的板条可放回铝箔袋，严密封口于 2 - 8°C 保存，避免吸湿
标准品	现配现用
检测抗体	
酶结合物	
5×样品/抗体/酶稀释液	2 - 8°C 贮存 1 个月，避免污染
20×洗液	
底物液	2 - 8°C 贮存 1 个月，需避光
终止液	可常温贮存
封板膜	

### 五、注意事项

- 1、试剂盒需在保质期内使用完毕。禁止不同批次的相关试剂进行混用。
- 2、本产品仅能够应用于检测说明书中标注的靶点抗原与样本。其它应用需经使用者设计验证后，根据结果评估使用的可靠性与准确性。
- 3、本产品仅用于研究，不能用于临床诊断或治疗。
- 4、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 5、不要混合或替代其他试剂盒批次的试剂或材料的供应商。

## 六、常见技术提示

- 1、生成高于最高标准的值时，样本应在适当的样品稀释缓冲液中进一步稀释。
- 2、混合或重组时避免产生泡沫。
- 3、在添加标准品、样本和其他加量时，要及时更换枪头，避免交叉污染。
- 4、在孵育期间，保证酶标板适当密封或封板膜覆盖完全。
- 5、请在清洗步骤中完全清除所有溶液和缓冲液。
- 6、在溶解标准品之前，请勿将标准品管随意倒置。当将标准品管倒置后，加入缓冲液后请充分上下混匀，然后低速离心。
- 7、在实验过程中，所有的试剂应放置在冰盒上放置，试剂盒按照说明书要求放置。
- 8、在实验完成后及时丢弃缓冲液，即用即弃。
- 9、不同产品的试剂盒组分不同，不可交叉使用。

## 七、其他准备材料

这些材料不包括在工具包中，准备利于后续实验分析的工具：

- 1、酶标仪，在 450 nm 测量吸光度(参考波长 570 nm)。
- 2、恒温箱、自动微孔洗板机。
- 3、精密移液器，1  $\mu$ L 到 1mL 移液枪与配套枪头。
- 4、100 毫升和 1 升刻度量筒。
- 5、标准品或样品稀释试管。
- 6、吸水纸。
- 7、蒸馏水或去离子水。
- 8、计算机及软件分析。

## 八、实验前准备

### 1. 样本收集与处理

- 1) 细胞培养上清：1,000 $\times$ g 离心 10 分钟去除沉淀物，即刻检测，或者分装，-20 $^{\circ}$ C 以下贮存。
- 2) 血清样本：使用不含热原和内毒素的试管收集血清。血样凝集 30 分钟后，1,000 $\times$ g 离心 10 分钟。吸取血清样本之后即刻检测，或者分装，-20 $^{\circ}$ C 以下贮存。
- 3) 血浆样本：EDTA、枸橼酸钠或肝素抗凝收集血浆样本。1,000 $\times$ g 离心 30 分钟收集样本。即刻检测，或者分装，-20 $^{\circ}$ C 以下贮存。

本试剂盒可能适用于其它生物学样本。细胞培养上清、血清和血浆已经过验证。

注意：检测前，样本中可见的沉淀必须去除。不要使用严重溶血或高血脂的样本。样本应分装并贮存于-20 $^{\circ}$ C，以避免人 CD40 配体活性的丢失。如果在 24 小时内检测，样本可以存放在 2-8 $^{\circ}$ C，避免样本的反复冻融。在检测前，冷冻样本应缓慢地恢复至室温(25 $^{\circ}$ C $\pm$ 3 $^{\circ}$ C)，轻柔地混匀。

如果样本需要稀释，请使用指定的样本缓冲液进行稀释。

建议正常的血清/血浆样本(仅供参考)：2 倍（使用 1 $\times$ 样品稀释液）

参考步骤：取 500 $\mu$ L 血清/血浆样本加入 500 $\mu$ L 样品稀释液，混匀即为 2 倍稀释。

建议低蛋白细胞培养上清(仅供参考)：2 倍（使用 1 $\times$ 样品稀释液）

参考步骤：取 500 $\mu$ L 低蛋白细胞培养上清样本加入 500 $\mu$ L 样品稀释液，混匀即为 2 倍稀释。

因样本所含有目标蛋白的含量有差异，每个样本的稀释比例建议根据预实验结果或按实际情况判定。

## 2. 酶标板准备

酶标板在使用之前需恢复室温。未使用的板条应及时放入干燥剂密封后储存在 4°C，建议每个样本复孔实验。

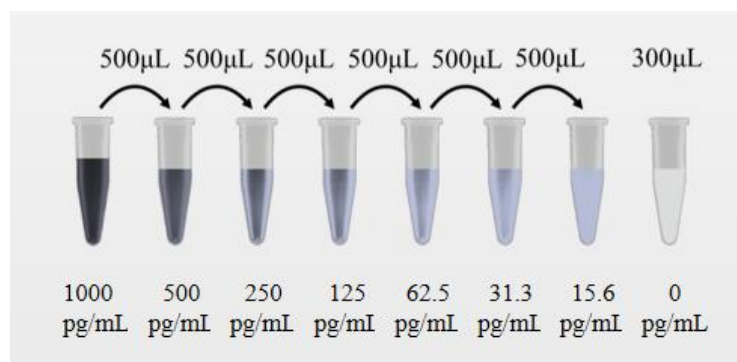
## 3. 试剂准备

使用前所有试剂组分以及待测样本需要恢复室温。为了保证实验的准确性，请在使用前 15 分钟内完成。

- 1) 1×洗液 配制：浓缩液平衡至室温，充分溶解，不要有结晶。混匀，取 25 mL 20×洗液至超纯水中，然后定容到 500mL；具体配制体积，可按照每次使用量进行配制。
- 2) 1×样品稀释液 配制：浓缩液平衡至室温，充分溶解，不要有结晶。混匀，取 12 mL 5×样品稀释液至超纯水中，然后定容到 60mL；具体配制体积，可按照每次使用量进行配制。样品稀释液用来稀释标准品和待测样品。
- 3) 检测抗体 配制：取检测抗体冻干粉 900ng，加入 1mL 抗体稀释液，得到 900ng/mL，然后用抗体稀释液稀释至 75ng/mL 使用，可取 900ng/mL 中间液 500μL 定容至 6mL 抗体稀释液；具体配制体积，可按照每次使用量进行配制，充分混匀。
- 4) 酶结合物 配制：使用前 10000rpm 离心 20 秒，然后用酶稀释液以 1：200 稀释至工作浓度使用，可取 60μL 定容至 12mL 酶稀释液；具体配制体积，可按照每次使用量进行配制，充分混匀。
- 5) 标准品曲线的制备：准备 8 个无菌的 1.5mL 离心管，按照标准品浓度依次进行标记。S1 制备：取标准品冻干粉 1ng，加入 1mL 1×样品稀释液，得到 S1=1000pg/mL。其余管移取 500μL 1×样品稀释液，取 S1 500μL 至下一个标记浓度的离心管中，混匀，进行一系列 2 倍梯度稀释标准品，起始最高浓度标记 1000 pg/mL，最低浓度为 15.6 pg/mL，可按照下面的配制方法进行。每次试验均需制备相应的标准曲线，不同试剂盒以及不同时间的标准曲线不能混用。样本测试时，每个孔所需标品量为 100μL，注意配制体积要高于所需体积，避免体积使用量不足。

表 3 人 CD40 配体(Human CD40 ligand) 标准品体系配制 (15.6-1000 pg/mL)

标准曲线	样品稀释液 (μL)	标准品添加体积 (μL)	标准品终浓度(pg/mL)
S1	1000	0	1000
S2	500	500	500
S3	500	500	250
S4	500	500	125
S5	500	500	62.5
S6	500	500	31.3
S7	500	500	15.6
Blank	300	0	0



## 九、实验方法

使用前所有试剂组分以及待测样本需要恢复室温。强烈建议所有的标准品和待检样本进行双复孔测定。

1. 试剂准备：备好各种待测试剂、稀释好的标准品和待测样本。
2. 标条确定：计算待测样本和标准品所需酶标条，将酶标条从铝箔袋取出，剩余酶标条放回铝箔袋中并封好袋口，低温保存。

- 3.浸泡酶标板：加入 1×洗液(300 μL/孔)浸泡酶标板，静置 30 秒后弃去孔中液体，拍干酶标板。液量对试验结果有重要影响，确保最后一次拍板没有洗液残留。
- 4.加样孵育：加入各梯度标准品和已稀释待测样本，100 μL/孔，确保 15 分钟内完成点样，室温孵育 2 小时。
- 5.清洗酶标板：弃去孔中液体，加入 1×洗液(350 μL/孔) 洗板 3 次，拍干酶标板。
- 6.检测抗体孵育：将预先配制至工作浓度的检测抗体加入酶标板中，100 μL/孔，室温孵育 2 小时。
- 7.清洗酶标板：弃去孔中液体，加入 1×洗液(350 μL/孔) 洗板 3 次，拍干酶标板。
- 8.酶结合物孵育：将预先配制至工作浓度的酶结合物加入酶标板中，100 μL/孔，室温孵育 30 分钟。
- 9.清洗酶标板：弃去孔中液体，加入 1×洗液(350 μL/孔) 洗板 3 次，拍干酶标板。
- 10.显色：使用前 10 分钟 将底物液恢复至室温，将底物液加入酶标板中，100 μL/孔，室温避光孵育 20 分钟。
- 11.终止：加入 50 μL/孔终止液至酶标板中，轻轻震动酶标板至显色均匀。
- 12.读值：10 分钟内读取 450nm/570nm 的光吸收值。

## 十、标曲制定

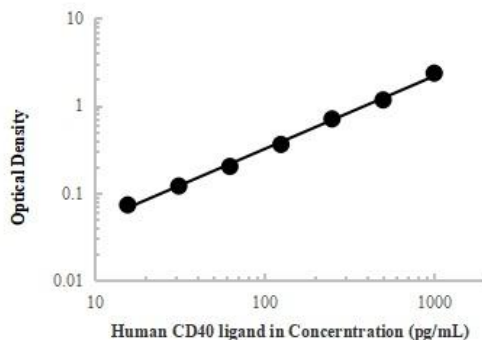
取标准品、空白对照、样本 450nm 的平均光吸收值，减去 570nm 对照的平均光吸收值，得到标准品、样品的光吸收校准值。以标准品浓度为横坐标，校准后的标准品光吸收值为纵坐标绘制标准曲线。多种绘图和统计学软件可以用于辅助绘制标准曲线并进行未知样本浓度的计算。四参数拟合法往往曲线拟合效果较好，其它方法如线性，双对数法也可能获得较好拟合结果，需要根据具体实验数据进行分析。

## 十一、实验数据

### 1.标曲数据

数据拟合绘制标准曲线，生成的标曲用于实验数据分析。

标准曲线图



浓度 (pg/mL)	显色值		平均值	校准值
	2.384	2.308		
1000	2.384	2.308	2.346	2.346
500	1.196	1.119	1.158	1.158
250	0.708	0.698	0.703	0.703
125	0.365	0.353	0.359	0.359
62.5	0.209	0.193	0.201	0.201
31.25	0.121	0.119	0.120	0.120
15.625	0.076	0.071	0.073	0.073
0	0.027	0.026	0.027	/



## 2.灵敏度检测

人 CD40 配体的最低检测限为 0.557 pg/mL，通过使用重复检测 20 次零孔 OD 值的均值与标准差计算得出。

## 3.精密度检测

酶标板内精密度

3 个已知浓度的样本酶标板内重复测定 20 次，评估酶标板内的精密度。

酶标板间精密度

3 个已知浓度的样本酶标板间重复检测 36 次，评估酶标板间的精密度。

项目	板内精密度			板间精密度		
	1	2	3	1	2	3
样本	20	20	20	36	36	36
平均值	642.4	256.2	65.7	667.2	268.8	66.5
标准差	23.4	9.6	3.3	22.1	11.6	1.9
变异系数	3.6%	3.7%	5.0%	3.3%	4.3%	2.8%

## 4.回收率检测

通过不同水平的人 CD40 配体添加于样本中来测定回收率，其回收率如下：

样本类型	平均回收率(%)	范围 (%)
血清	109.4%	97.3-125.0%
血浆	107.1%	88.3-124.1%
细胞培养上清	106.8%	94.6-122.7%

## 5.稀释线性检测

血清稀释比例	平均期望值(%)	范围 (%)
1: 02	106.5%	86.1-122.2%
1: 04	110.1%	84.7-125.9%
1: 08	111.2%	76.6-124.8%
1: 16	100.3%	89.7-112.4%

血浆稀释比例	平均期望值(%)	范围 (%)
1: 02	105.3%	87.7-117.7%
1: 04	108.0%	92.1-119.3%
1: 08	101.5%	80.6-117.7%
1: 16	94.8%	91.4-99.9%

细胞培养上清稀释比例	平均期望值(%)	范围 (%)
1: 02	111.9%	104.5-120.4%
1: 04	115.2%	111.9-121.8%
1: 08	110.4%	105.3-118.3%
1: 16	106.5%	103.5-111.6%

## 6. 样本值

应用本试剂盒，检测若干健康志愿者的样本，志愿者的用药史不详。

样本类型	样本数目	平均值 (pg/mL)	样本值 (pg/mL)
血清	10	289	85-905
EDTA 血浆	5	297	nd-684
肝素血浆	3	59	nd-164
枸橼酸钠血浆	4	279	nd-514
细胞培养上清	10	nd	nd

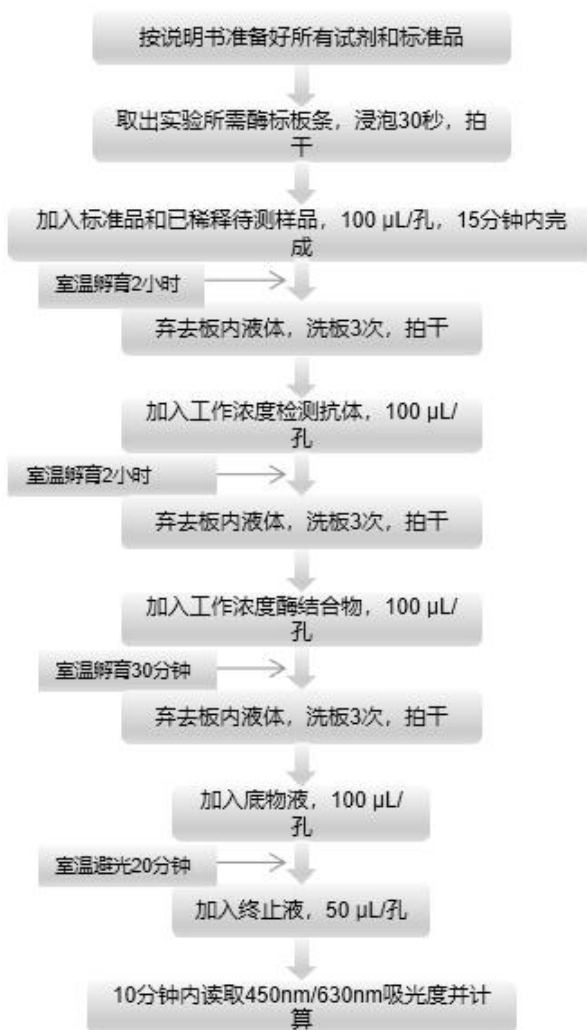
n.d. 指样本浓度值低于检测范围内的 15.6 pg/mL

## 7. 测定特异性

本试剂盒识别天然和重组人 CD40 配体。在 50 ng/mL 条件下制备的下列因子进行了测定，没有观察到明显的交叉反应和干扰影响。

Recombinant human	Recombinant mouse
ANG、ANG-2、AR、BDNF、CD4、CD40、 CNTF、CT-1、CTLA-4、Epo、Fas、 GDNF、GITR、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-1ra	CD40 Ligand、CT-1、CTLA-4、 Fas、Fas Ligand、GITR Ligand、 IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-1ra、 IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、 IL-7

## 十二、检测简图



## 十三、疑问解答

问题	造成原因	解决方法。
标曲不好	移液量不准确	检查移液器, 按时校准, 仔细操作, 充分混匀时盖紧管口并尽量避免泡沫。
	稀释方法不恰当	
显色值偏低	孵育时间太短	给与足够的孵育时间, 样本和溶解的标准品隔夜后更换。
	移液量不足或稀释不当	检查移液器和操作得当
CV 偏高	酶标板清洗不当	检查洗涤工序, 确保使用正确的洗涤工艺; 如果使用洗板机, 检查所有的端口是否堵塞。
	受污染清洗缓冲液	准备新鲜洗涤缓冲液
灵敏度较低	试剂盒储存不当	按照产品组分表进行组分的保存。





---

---

Good science

Good products

翌圣生物科技（上海）股份有限公司

服务电话:400-6111-883

咨询邮箱:marketing@yeasen.com

网 址:www.yeasen.com

地 址:上海市浦东新区国际医学园区天雄路166号1号楼402室

