

人NCAM1双抗夹心ELISA检测试剂盒

请在实验前仔细阅读本说明书

产品货号: KE00349
规格: 96T
灵敏度: 0.01 ng/mL
检测范围: 0.156-10 ng/mL
用途: 此试剂盒用于定量检测血清、血浆以及脑脊液中的人NCAM1浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

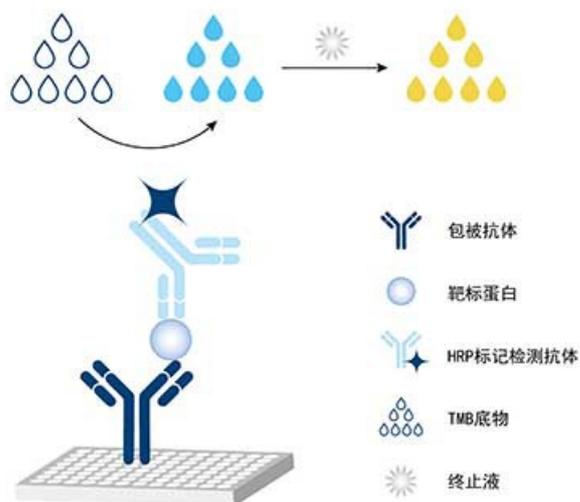
目录

一：背景信息	3
二：检测原理	3
三：需自备的实验器材	3
四：试剂盒组分及储存	4
五：实验注意事项	4
六：样本准备	4
七：试剂准备	5
八：实验步骤	6
九：实验参数	7
9.1 参考标曲图	7
9.2 精密度	7
9.3 加标回收率	7
9.4 样本值	8
9.5 灵敏度	8
9.6 线性	8
9.7 特异性	8
十：参考文献	9

一：背景信息

神经细胞粘附分子1 (NCAM1, 又称CD56)是免疫球蛋白(Ig)超家族中的一种细胞粘附糖蛋白。它是一种参与突触可塑性、神经发育和神经发生的多功能蛋白。NCAM1在人类神经元、神经胶质细胞、骨骼肌细胞、NK细胞和一部分T细胞上表达, 在多种人类肿瘤中均有表达, 包括骨髓瘤、髓性白血病、神经内分泌肿瘤、Wilms肿瘤、神经母细胞瘤和NK/T细胞淋巴瘤。NCAM1的三个主要同工异构体, 分子量分别为120、140和180 kDa, 是由mRNA的选择性剪接产生的。糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定的NCAM120和跨膜NCAM140和NCAM180由5个Ig-like样结构域和2个纤维连接型重复序列(FNIII)组成。

二：检测原理



◀双抗夹心模式图 (检测抗体直标HRP)

按操作顺序形成抗体夹心结构后, 加入TMB底物, 板孔液体由无色变成蓝色, 再加入终止液液体变为黄色后进行吸光度值测定。

三：需自备的实验器材

- 3.1 酶标仪 (可读取450 nm和630 nm双波长);
- 3.2 高精度移液器及一次性移液器枪头;
- 3.3 洗板机 (亦可手动洗板);
- 3.4 EP管 (用于稀释标准品及样本);
- 3.5 吸水毛巾或滤纸 (用于拍干);
- 3.6 烧杯和量筒;
- 3.7 用于ELISA实验的数据分析的统计拟合软件 (推荐四参数拟合方法), 如: Origin, ELISA Calc等。

四：试剂盒组分及储存

英文名称	中文名称	规格	数量
Microplate	预包被酶标板 - 96孔板	8孔 × 12条	1 块
Protein standard	标准品 - 冻干粉状 *	20 ng/瓶	2 瓶
Detection antibody, HRP-conjugated (100×)	HRP标记检测抗体浓缩液 (100×) **	120 μL/支	1 支
Sample Diluent PT 4B1	样本稀释液 PT 4B1	30 mL/瓶	2 瓶
Detection Diluent	抗体稀释液	30 mL/瓶	1 瓶
Wash Buffer Concentrate (20×)	浓缩洗涤液 (20×)	30 mL/瓶	1 瓶
TMB	显色底物 TMB	12 mL/瓶	1 瓶
Stop Solution	终止液	12 mL/瓶	1 瓶
Plate Cover Seals	封板膜		4 张

储存条件：

- 1：未开启试剂盒可在2-8°C条件下存放6个月或者在-20°C条件下存放1年
- 2：已开启试剂盒可在2-8°C存放7天
- 3：每次实验均使用新的标准品,使用后丢弃

* 使用对应的样本稀释液对标准品进行复溶，复溶过程避免产生气泡

** 开盖前请离心

五：实验注意事项

- 5.1 避免皮肤接触终止液以及TMB 显色液；
- 5.2 在实验过程中，注意穿戴个人防护装备，如实验服，手套，口罩和护目镜；
- 5.3 请勿将不同批次的试剂进行混用，过期产品请勿使用；
- 5.4 在使用自动洗板机时，板孔加入洗涤液之后，设置30秒的浸泡程序，以提高分析的精确度。

六：样本准备

- 6.1 血清：全血标本室温凝固 30 min后1000×g 离心15 min，取上清立即使用或分装后-20°C存放，避免反复冻融。
- 6.2 血浆：可用EDTA、肝素或柠檬酸盐作为抗凝剂，标本采集后1000×g 离心15 min，立即使用或分装后-20°C存放，避免反复冻融
(注意：标本溶血会影响检测结果，因此溶血标本不宜进行检测)。
- 6.3 脑脊液：收集脑脊液后10000×g 离心5 min，取上清立即使用或分装后-20°C存放，避免反复冻融。

七：试剂准备

7.1 洗涤液 (1×)：

如果洗涤液 (20×) 有晶体析出, 37°C加热至晶体全部溶解。按1:20稀释倍数进行稀释: 如取30 mL 浓缩洗涤液 (20×), 加入570 mL 超纯水或去离子水, 得到洗涤液 (1×)。

7.2 HRP标记检测抗体 (1×)：

开盖前瞬时离心, 按1:100比例进行稀释, 稀释前根据预先计算实验所需的总量配制 (100 μL/孔), 实际配制时应多配制0.1-0.2 mL。如10 μL HRP标记检测抗体浓缩液 (100×) 加 990μL 抗体稀释液进行配制, 轻轻混匀。

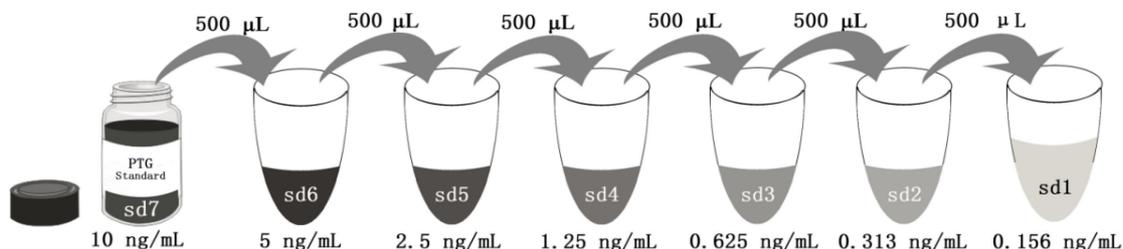
7.3 待检测样本：

不同的样本使用相应的样本稀释液进行稀释, 如果样本检测值超过标曲最高范围, 可将样本进行一定的稀释后再进行实验, 使样本的检测值处于标曲范围内, 不同样本的稀释倍数需自行优化。

稀释比推荐如下: 人血清和血浆样本1:200或1:400稀释; 脑脊液样本1:40或1:80稀释。样品采集、处理和储存的差异可能导致测值的改变。

7.4 梯度稀释的标准品：

用2 mL PT 4B1样本稀释液复溶标准品。具体操作如下：



Add # μL of Standard diluted in the previous step	—	500 μL					
# μL of Sample Diluent PT 4B1	2000 μL	500 μL					
	"sd7"	"sd6"	"sd5"	"sd4"	"sd3"	"sd2"	"sd1"

八：实验步骤

实验前，需要将所需试剂在室温平衡20-30min（HRP标记检测抗体浓缩液不需要平衡室温，即用即取）；在进行标准品、样本以及不同试剂加样时，更换枪头，避免接触微孔板的内表面，不同的试剂，使用不同的加样槽；

8.1 根据实验用量，取出需要用到的酶标板条，剩余板条加入干燥剂放入铝箔袋密封后存放于4°C，并于一周之内用完；

8.2 加样，分别设零孔、标准孔、待测样本孔。零孔加样本稀释液100 μL，余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本100 μL/孔，注意不要产生气泡（建议标准品和样本都做复孔，尽量避免实验误差，确保上样不间断，5-10 min完成加样）；

8.3 酶标板盖上覆膜，37°C孵育2 h；

8.4 洗涤

1) 揭开封板膜（动作轻柔，避免动作过大导致液体溢出串孔），弃液体，拍干；

2) 洗涤液（1×）洗涤板条，每孔350-400 μL，洗涤后，甩掉液体拍干板条，重复此步骤4次，避免异物进入板孔以及板条干燥；

8.5 每孔加100 μL HRP标记检测抗体（1×）（参照试剂准备部分7.2），盖上封板膜，37°C孵育40 min；

8.6 重复步骤8.4；

8.7 显色：每孔加TMB显色液100 μL，37°C避光显色 15-20 min（如果颜色偏浅，可适当延长显色时间，不超过30 min；保持显色底物始终处于避光状态，显色底物在加样前应是无色透明，如有变色，请勿使用）；

8.8 终止：每孔加终止液100 μL，蓝色变黄色。终止液与TMB显色液的加样顺序一致；（注意：眼睛和皮肤避免接触终止液）

8.9 读数：以630 nm为校正波长，用酶标仪在450 nm波长测量各孔的光密度(OD值)。加入终止液后5 min内进行读数，若无630 nm波长，也可直接使用450 nm 波长读数；

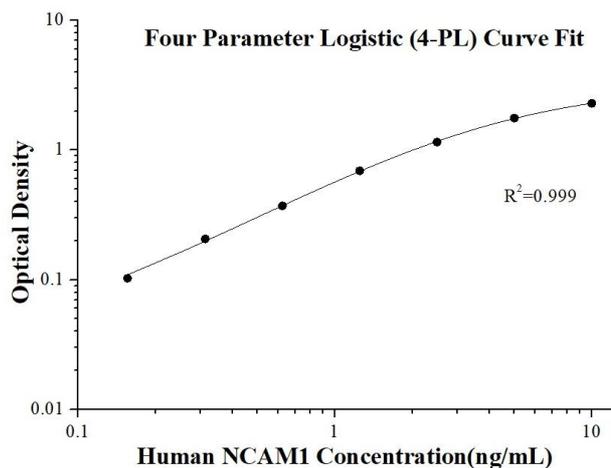
8.10 数据分析：每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD值为纵坐标，使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

操作流程如下：

步骤	试剂	体积	孵育时间	洗涤次数	孵育温度
1	标准品或样本	100 μL	120 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
2	HRP标记检测抗体（1×）	100 μL	40 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
3	显色 TMB	100 μL	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37°C孵育，避光
4	终止液	100 μL	0 分钟	不需要洗涤	-
5	加入终止液后以630 nm为校正波长，在450 nm处测量OD值，此过程建议不超过5分钟				

九：实验参数

9.1 参考标曲图



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.0777 0.0553	0.0665	-
0.156	0.1736 0.1645	0.16905	0.10255
0.313	0.2719 0.2736	0.27275	0.20625
0.625	0.4178 0.458	0.4379	0.3714
1.25	0.7498 0.77	0.7599	0.6934
2.5	1.2057 1.2344	1.22005	1.15355
5	1.7691 1.8951	1.8321	1.7656
10	2.3376 2.3794	2.3585	2.292

9.2 精密度

板内精密度：3个不同浓度的样本在板内重复测定 20次；

板间精密度：3个不同浓度的样本在板间重复测定 24次。

板内精密度 (CV内)				
样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%
1	20	5.70	0.37	6.56
2	20	1.14	0.11	9.53
3	20	0.31	0.02	7.89

板间精密度 (CV 间)				
样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%
1	24	5.84	0.44	7.59
2	24	1.11	0.08	7.60
3	24	0.27	0.02	7.61

9.3 加标回收率

样本稀释后，在标曲范围内选择高、中、低3个浓度，进行人NCAM1的加标回收率实验，结果如下：

样本类型	稀释倍数	平均值 (%)	范围 (%)
人血清	1:400	94	86-101
	1:800	101	88-117
脑脊液	1:100	90	81-111
	1:200	96	89-113

9.4 样本值

人血清 - 应用本试剂盒，检测人血清样本中人NCAM1的浓度。

样本类型	均值 (µg/mL)	范围 (µg/mL)
人血清样本 (n=16)	1.20	0.72-1.91

脑脊液 - 应用本试剂盒，检测脑脊液样本中人NCAM1的浓度，测量均值为127.30 ng/mL。

9.5 灵敏度

用20个重复的零孔平均OD值加上两倍标准差得到的OD值带入标准曲线拟合出对应的浓度值，此试剂盒中人NCAM1的灵敏度为0.01 ng/mL。

9.6 线性

用对应样本稀释液稀释样本，使稀释后的检测值处于标曲范围内，线性数据如下：

(人血清样本预先稀释50倍；脑脊液样本预先稀释20倍。)

		人血清	脑脊液
1:2	均值 (%)	100	100
	范围 (%)	-	-
1:4	均值 (%)	116	99
	范围 (%)	110-122	98-99
1:8	均值 (%)	114	92
	范围 (%)	105-122	91-94
1:16	均值 (%)	112	87
	范围 (%)	106-117	86-88

9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人NCAM1，加入50 ng/mL以下细胞因子，无明显交叉反应。

human:

BCAM

EpCAM

NCAM-L1

十：参考文献

1. Maria-Isabel T. et al. (1998). *J Virol.* 72(9): 7181-7190.
2. Ralf K. et al. (2004). *Nat Rev Neurosci.* 5(3): 195-208.
3. E Phimister. et al. (1991). *J Clin Pathol.* 44(7): 580-585.
4. Adam N. et al. (2017). *Immunol Lett.* 185: 93-97.
5. Markus A. et al. (2019). *Acta Neurol Scand.* 139(5): 422-427.