

## 人CD163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: KE00190  
规格: 96T  
灵敏度: 1.2 ng/mL  
检测范围: 6.25 - 400 ng/mL  
用途: 此试剂盒用于定量检测血清和血浆中人CD163浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

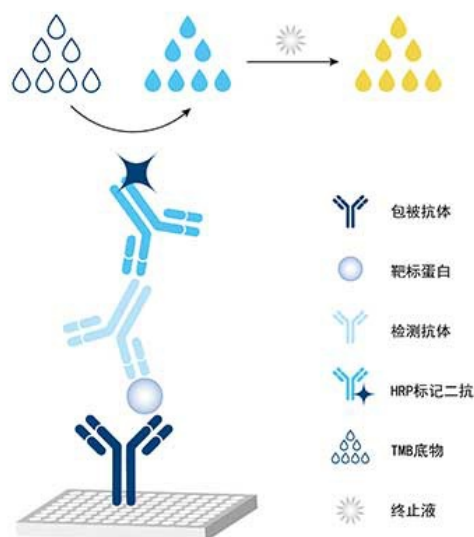
## 目录

|            |   |
|------------|---|
| 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    | 7 |
| 9.5 灵敏度    | 8 |
| 9.6 线性     | 8 |
| 十：参考文献     | 8 |

## 一：背景信息

CD163，也称为M130，是一种属于清道夫受体超家族的跨膜糖蛋白，由含有9个清道夫受体富含半胱氨酸（SRCR）B型结构域的胞外段、一个跨膜片段和一个胞质尾区组成，特异性表达于单核-巨噬细胞膜上。CD163介导结合珠蛋白-血红蛋白复合物的内吞，有助于铁的循环和抗炎反应。膜结合型CD163的胞外域在巨噬细胞炎性活化过程中从细胞上脱落，成为可溶性CD163（sCD163）。血液中的sCD163被认为是巨噬细胞活性的标志物。

## 二：检测原理



### ◀双抗夹心模式图 (检测抗体不标记)

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 *         | 400 ng/瓶 | 2 瓶 |
| Detection antibody (100×)                                                                          | 检测抗体浓缩液 (100×) **    | 120 µL/支 | 1 支 |
| HRP-conjugated antibody (100×)                                                                     | HRP标记二抗浓缩液 (100×) ** | 120 µL/支 | 1 支 |
| Sample Diluent PT 3-ec                                                                             | 样本稀释液 PT 3-ec        | 30 mL/瓶  | 1 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 |
| Tetramethylbenzidine Substrate (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 |
| <b>储存条件：</b><br>1：未开启试剂盒可在2-8℃条件下存放6个月或者在-20℃条件下存放1年<br>2：已开启试剂盒可在2-8℃存放7天<br>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℃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℃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)。

七：试剂准备

7.1 洗涤液（1×）：

如果洗涤液（20×）有晶体析出，37℃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 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 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 HRP标记二抗（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标记二抗浓缩液（100×）加 990μL 抗体稀释液进行配制，轻轻混匀。

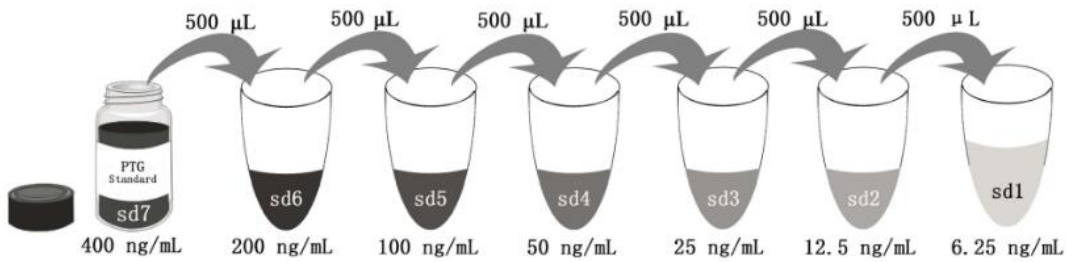
7.4 待检测样本：

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1:2或1:4稀释；样品采集、处理和储存的差异可能导致测值的改变。

7.5 梯度稀释的标准品：

使用1 mL PT 3-ec 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 | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL |
| # μL of Sample Diluent PT 3-ec                    | 1000 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 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20-30 min(检测抗体 浓缩液、HRP标记二抗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  $\mu$ L,余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本100  $\mu$ L/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 $\times$ )洗涤板条,每孔350-400  $\mu$ L,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  $\mu$ L 检测抗体(1 $\times$ )(参照试剂准备部分7.2),盖上封板膜,37°C孵育1 h;

8.6 重复步骤8.4;

8.7 每孔加 100  $\mu$ L HRP标记二抗(1 $\times$ )(参照试剂准备部分7.3),盖上封板膜,37°C孵育40 min;

8.8 重复步骤8.4;

8.9 显色:每孔加TMB显色液100  $\mu$ L,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);

8.10 终止:每孔加终止液100  $\mu$ L,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)

8.11 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;

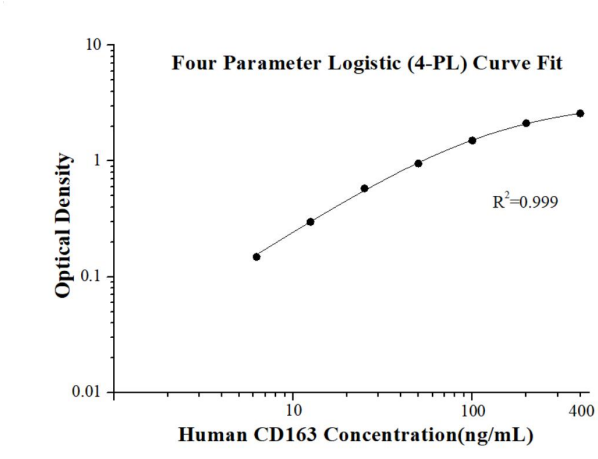
8.12 数据分析:每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值,设置复孔,取其平均值。以标准品的浓度为横坐标,OD 值为纵坐标,使用专业软件(如Origin、ELISACalc等)进行四参数拟合(4-PL),根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度,乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

### 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 $\mu$ L | 120 分钟   | 4 次   | 覆膜后37°C孵育    |
| 2  | 检测抗体(1 $\times$ )                            | 100 $\mu$ L | 60 分钟    | 4 次   | 覆膜后37°C孵育    |
| 3  | HRP标记二抗(1 $\times$ )                         | 100 $\mu$ L | 40 分钟    | 4 次   | 覆膜后37°C孵育    |
| 4  | 显色 TMB                                       | 100 $\mu$ L | 15-20 分钟 | 不需要洗涤 | 覆膜后37°C孵育,避光 |
| 5  | 终止液                                          | 100 $\mu$ L | 0 分钟     | 不需要洗涤 | -            |
| 6  | 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       | 0.057<br>0.058 | 0.058   | -         |
| 6.25    | 0.214<br>0.198 | 0.206   | 0.149     |
| 12.5    | 0.371<br>0.340 | 0.356   | 0.298     |
| 25      | 0.614<br>0.661 | 0.638   | 0.580     |
| 50      | 1.013<br>1.007 | 1.010   | 0.953     |
| 100     | 1.588<br>1.535 | 1.562   | 1.504     |
| 200     | 2.168<br>2.185 | 2.177   | 2.119     |
| 400     | 2.589<br>2.675 | 2.632   | 2.575     |

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 | 44.3        | 1.2 | 2.8     |
| 2           | 20 | 64.2        | 1.7 | 2.7     |
| 3           | 20 | 195.9       | 6.7 | 3.4     |

| 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 | 50.9        | 3.7  | 7.2     |
| 2            | 24 | 76.4        | 6.2  | 8.1     |
| 3            | 24 | 247.5       | 21.3 | 8.6     |

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CD163的加标回收率实验，结果如下：

| 样本类型 | 稀释倍数 | 均值 (%) | 范围 (%) |
|------|------|--------|--------|
| 人血清  | 1:4  | 90     | 80-107 |
|      | 1:8  | 97     | 78-112 |

## 9.4 样本值

应用本试剂盒，检测来自人血清和血浆中人CD163的浓度：

| 样本类型       | 均值 (ng/mL) | 范围 (ng/mL)  |
|------------|------------|-------------|
| 人血浆 (n=32) | 233.2      | 71.1-642.9  |
| 人血清 (n=24) | 294.2      | 100.7-789.3 |

## 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CD163的灵敏度为1.2 ng/mL。

## 9.6 线性

用对应样本稀释液稀释样品检测样本线性，稀释后检测值应处于标曲范围内，结果如下：

| 样本类型 | 稀释倍数 | 均值 (%) | 范围 (%)  |
|------|------|--------|---------|
| 人血清  | 1:2  | 100    | -       |
|      | 1:4  | 114    | 105-123 |
|      | 1:8  | 97     | 88-106  |
|      | 1:16 | 76     | 74-78   |

## 十：参考文献

1. Law SK, Micklem KJ, Shaw JM, et al. A new macrophage differentiation antigen which is a member of the scavenger receptor superfamily. Eur J Immunol. 1993;23(9):2320-2325.
2. Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. Nature. 2001;409(6817):198-201.
3. Etzerodt A, Moestrup SK. CD163 and inflammation: biological, diagnostic, and therapeutic aspects. Antioxid Redox Signal. 2013;18(17):2352-2363.
4. Møller HJ, Aerts H, Grønbaek H, et al. Soluble CD163: a marker molecule for monocyte/macrophage activity in disease. Scand J Clin Lab Invest Suppl. 2002;237:29-33.