

## 人CD38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: KE00253  
规格: 96T  
灵敏度: 0.029 ng/mL  
检测范围: 0.5-32 ng/mL  
用途: 此试剂盒用于定量检测血清、血浆以及细胞裂解液中人CD38浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

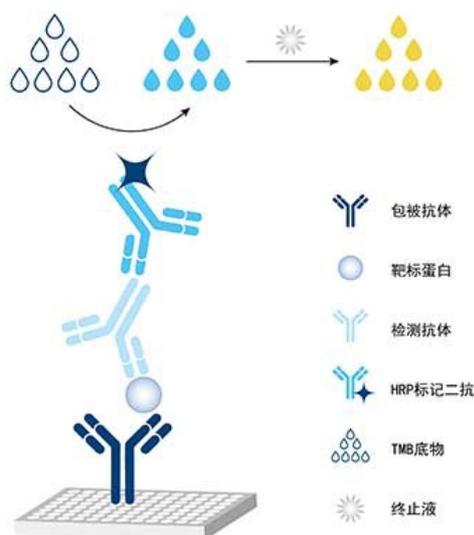
## 目录

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	8
9.4 样本值	8
9.5 灵敏度	8
9.6 线性	9
十：参考文献	9

## 一：背景信息

CD38，也称为ADP-核糖基环化酶，是一种II型跨膜糖蛋白，具有一个短的N端细胞质尾部、一个单次跨膜结构域和一个含四个N-糖基化位点的C端胞外区域。CD38胞外结构域具有双功能酶活性，可催化烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NAD）合成环状ADP核糖，并将环状ADP核糖水解为二磷酸腺苷。CD38在多种造血细胞及非造血细胞上表达，并参与多种过程，如钙动员代谢物的合成、细胞激活和趋化作用。除存在于细胞膜上，CD38也存在可溶形式（sCD38），其通过从细胞膜表面发生蛋白水解而产生。

## 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 *	64 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 1	样本稀释液 PT 1 (用于人血清和血浆样本)	30 mL/瓶	1 瓶
Sample Diluent PT 4-ef	样本稀释液 PT 4-ef (用于细胞裂解液样本)	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
Extraction Reagent	裂解液	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

**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 细胞裂解液: 收集细胞后, 用预冷(2-8°C)的1×PBS洗3次, 500×g离心5 min。细胞计数, 离心弃上清; 加PMSF至细胞裂解液中, 终浓度为1 mM; 按每 $1 \times 10^7$ 个细胞, 加入1 mL细胞裂解液(含PMSF), 冰上裂解30 min, 其间上下颠倒使裂解更充分, 超声波破碎处理, 8000×g-10000×g离心5 min, 分离上清, 分装后-80°C存放, 并用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定总蛋白浓度, 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 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 990 μL 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 990 μL 抗体稀释液进行配制, 轻轻混匀。

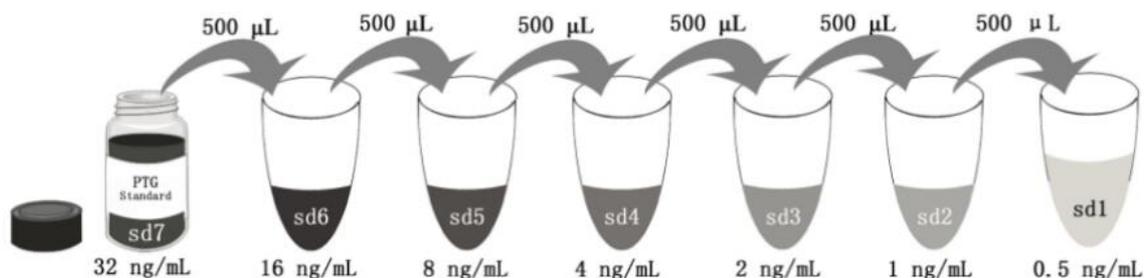
### 7.4 待检测样本：

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; 细胞裂解液样本1:64或1:128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：

检测人血清和血浆样本, 使用2 mL PT 1 样本稀释液复溶标准品; 检测细胞裂解液样本, 使用2 mL PT 4-ef 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 1 or PT 4-ef	<b>2000 μL</b>	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 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 检测抗体(1×)(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 μL HRP标记二抗(1×)(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 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) ;

8.10 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)

8.11 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;

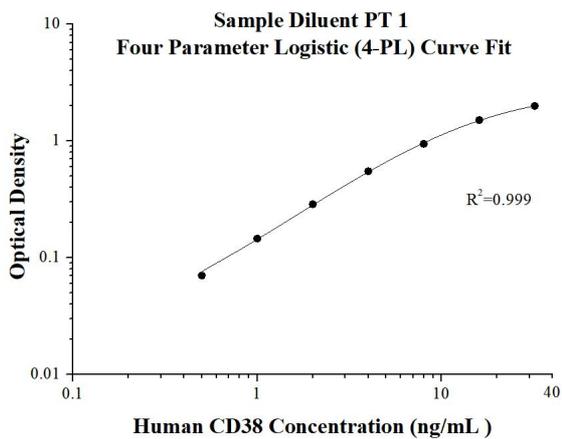
8.12 数据分析:每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值,设置复孔,取其平均值。以标准品的浓度为横坐标,OD 值为纵坐标,使用专业软件(如Origin、ELISACalc等)进行四参数拟合(4-PL),根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度,乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

### 操作流程如下:

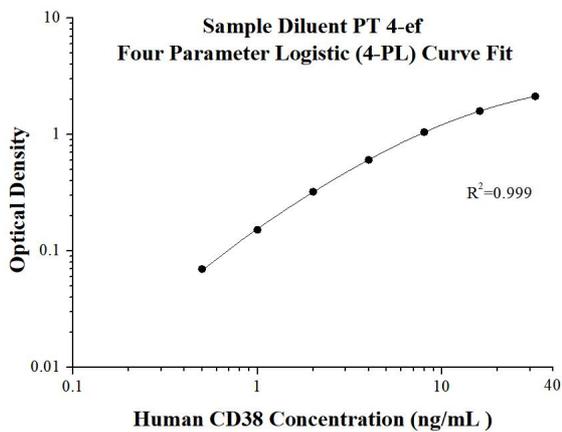
步骤	试剂	体积	孵育时间	洗涤次数	孵育温度
1	标准品或样本	100 μL	120 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
2	检测抗体(1×)	100 μL	60 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
3	HRP标记二抗(1×)	100 μL	40 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
4	显色 TMB	100 μL	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37°C孵育,避光
5	终止液	100 μL	0 分钟	不需要洗涤	-
6	加入终止液后以630 nm为校正波长,在450 nm处测量OD值,此过程建议不超过5分钟				

## 九：实验参数

### 9.1 参考标曲图



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.074 0.078	0.076	-
0.5	0.142 0.15	0.146	0.07
1	0.22 0.223	0.2215	0.1455
2	0.358 0.366	0.362	0.286
4	0.63 0.622	0.626	0.55
8	1.028 1.008	1.018	0.942
16	1.588 1.583	1.5855	1.5095
32	2.045 2.095	2.07	1.994



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.072 0.071	0.0715	-
0.5	0.142 0.14	0.141	0.0695
1	0.218 0.228	0.223	0.1515
2	0.391 0.396	0.3935	0.322
4	0.683 0.668	0.6755	0.604
8	1.133 1.102	1.1175	1.046
16	1.678 1.643	1.6605	1.589
32	2.255 2.142	2.1985	2.127

### 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	14.22	0.51	3.6
2	20	3.45	0.07	2.0
3	20	0.78	0.02	3.0

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	14.60	0.66	4.5
2	24	3.50	0.11	3.3
3	24	0.79	0.03	3.6

### 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CD38的加标回收率实验，结果如下：

样本类型	稀释倍数	均值 (%)	范围 (%)
人血浆	1:2	85	83-88
	1:4	86	80-91
细胞裂解液	1:256	112	101-125
	1:512	105	81-117

### 9.4 样本值

血清血浆：应用本试剂盒，检测健康人血清和血浆中人CD38的浓度。

样本类型	均值 (ng/mL)	检出率 (%)	范围 (ng/mL)
人血清 (n=7)	0.42	22.22	ND*-1.98
人血浆 (n=9)	0.75	28.57	ND*-3.35

ND\*=Non-detectable

细胞裂解液

样本类型	CD38 (ng/mL)	总蛋白 (mg/mL)
Daudi 细胞裂解液	680.6	2.8
Ramos 细胞裂解液	608.2	9
K-562 细胞裂解液	87	9.2

### 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CD38的灵敏度为 0.029 ng/mL。

## 9.6 线性

人血浆样本加入高浓度的人CD38蛋白，梯度稀释后检测样本加标线性，细胞裂解液样本用对应样本稀释液稀释，使稀释后检测值应处于标曲范围内，线性如下：(细胞裂解液样本预先稀释32倍)

稀释倍数		人血浆 (样本稀释液PT 1)	细胞裂解液 (样本稀释液 PT 4-ef)
1:2	均值 (%)	78	100
	范围 (%)	77-79	-
1:4	均值 (%)	91	103
	范围 (%)	89-93	99-109
1:8	均值 (%)	97	86
	范围 (%)	95-99	72-96
1:16	均值 (%)	101	87
	范围 (%)	96-108	78-100

## 十：参考文献

1. Jackson DG, Bell JI. Isolation of a cDNA encoding the human CD38 (T10) molecule, a cell surface glycoprotein with an unusual discontinuous pattern of expression during lymphocyte differentiation. *J Immunol.* 1990;144(7):2811-2815.
2. Funaro A, Horenstein AL, Calosso L, et al. Identification and characterization of an active soluble form of human CD38 in normal and pathological fluids. *Int Immunol.* 1996;8(11):1643-1650.
3. Cho YS, Han MK, Choi YB, Yun Y, Shin J, Kim UH. Direct interaction of the CD38 cytoplasmic tail and the Lck SH2 domain. Cd38 transduces T cell activation signals through associated Lck. *J Biol Chem.* 2000;275(3):1685-1690.
4. Lebedev MJ, Egorova NI, Sholkina MN, Vilkov SA, Baryshnikov AJ, Novikov VV. Serum levels of different forms of soluble CD38 antigen in burned patients. *Burns.* 2004;30(6):552-556.
5. Schneider M, Schumacher V, Lischke T, et al. CD38 is expressed on inflammatory cells of the intestine and promotes intestinal inflammation. *PLoS One.* 2015;10(5):e0126007.