

## 人昼夜自发输出周期蛋白 kaput(CLOCK)ELISA 试剂盒

|            |                                 |              |                    |
|------------|---------------------------------|--------------|--------------------|
| <b>货号:</b> | PY1130Hu-T                      | <b>检测范围:</b> | 0.625ng/mL-20ng/mL |
| <b>种属:</b> | 人                               | <b>保存温度:</b> | 2-8°C              |
| <b>规格:</b> | 96T/48T                         | <b>有效期:</b>  | 6个月                |
| <b>用途:</b> | 用于体外定量检测细胞、血清、血浆以及其他样本中的人CLOCK。 |              |                    |

### ※ 实验原理

本试剂盒采用双抗体夹心法 ELISA 技术：将捕获抗体包被于酶标板上，捕获样品及标准品中的待测物 CLOCK，洗涤后，再加入生物素标记的检测抗体进行孵育后清洗，形成“捕获抗体-抗原-检测抗体”免疫复合物，随后加入链霉亲和素偶联的辣根过氧化物酶进行孵育，待孵育结束后清洗，过程中游离的成分均被洗去，接着加入 TMB 显色后，若样本中有待测物则显蓝色，加入终止液停止反应。用酶标仪在 450nm 处测 OD 值，颜色的深浅和样品中的待测物的含量呈正比，通过绘制标准曲线计算出样本中 CLOCK 的浓度。

### ※ 试剂盒组成

| 中文名称      | 96T 配置     | 48T 配置     | 保存条件  |
|-----------|------------|------------|-------|
| 预包被酶标板    | 96 孔       | 48 孔       | 2-8°C |
| 标准品(冻干粉)  | 2 支        | 1 支        |       |
| 标准品复溶液    | 2 支        | 1 支        |       |
| 标准品&样本稀释液 | 25mL × 1 瓶 | 25mL × 1 瓶 |       |
| 生物素抗体     | 10mL × 1 瓶 | 10mL × 1 瓶 |       |
| HRP 标记亲和素 | 10mL × 1 瓶 | 10mL × 1 瓶 |       |
| TMB 显色液   | 10mL × 1 瓶 | 10mL × 1 瓶 |       |
| 终止液       | 6mL × 1 瓶  | 6mL × 1 瓶  |       |
| 20×浓缩洗涤液  | 25mL × 1 瓶 | 25mL × 1 瓶 |       |
| 封板膜       | 4 张        | 4 张        | RT    |
| 产品说明书     | 1 份        | 1 份        |       |

**需要而未提供的物品：**

| 仪器设备                | 其它           |
|---------------------|--------------|
| 含 450nm 检测波长的酶标仪    | 吸水纸或者抽纸      |
| 各种量程移液器             | 蒸馏水或去离子水     |
| 可提供 37°C 环境的恒温箱或培养箱 | 各种规格吸头和 EP 管 |

※ **注意事项**

- 1. 本试剂盒仅供教研使用，不可作为体外诊断依据；**
- 预包被酶标板拆封后，未使用的板条请装入自封袋密封。为降低不同时间检测板内变异系数，间隔 48 小时内检测可 2-8°C 保存，如果间隔时间较长，请 -20°C 保存，并在下次检测时重新绘制标准曲线；
- 试剂盒提供的底物显色液使用前应保持无色或很浅颜色，直到添加到板中。如果收到的显色液显示很深蓝色，请联系售后技术支持；
- 此试剂盒提供的终止液为稀硫酸溶液，具有一定腐蚀性，应谨慎操作。如果不小心沾到皮肤上，请立即擦去，并用清水冲洗；**
- 请严格按照说明书进行操作；如有疑问，请一定与技术工程师确认后再进行操作，避免样本和时间上的浪费；**
- 不同批号试剂不建议混用，请勿使用其他品牌来源的试剂；
- 封板膜、吸水纸、加样过程中所用的 EP 管和吸头为一次性使用，严禁混用。

※ **样本处理及要求：**

- 1、血清：**将收集于血清分离管的全血标本在室温静置 30min 以上，不超过 2 小时，然后 2-8°C，2500-3500×g 离心 20min，仔细收集上清；
- 2、血浆：**应根据标本的要求选择 EDTA 或柠檬酸钠作为抗凝剂，样品采集后 30min 内在 2-8°C，3000×g 离心 15min，仔细收集上清。保存过程中如有沉淀形成，应再次离心；
- 3、尿液：**用无菌管收集，2-8°C，2500-3500×g 离心 10min，仔细收集上清。保存过程中如有沉淀形成，应再次离心。胸腹水、脑脊液参照实行；
- 4、细胞培养上清：**收集液体后于 2-8°C，2500-3500×g 离心 20min，除去杂质及细胞碎片，取上清检测。

- 5、**细胞裂解液**: 贴壁细胞用预冷的 PBS(0.01M,pH=7.4)轻轻清洗, 然后用胰蛋白酶消化, 2-8°C, 1000×g 离心 5min 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  $1 \times 10^6$  个细胞中加入 150-200 $\mu$ L PBS 重悬, 并通过反复冻融或超声使细胞破碎(推荐在 PBS 中加入蛋白酶抑制剂; 若含量很低可减少 PBS 的体积)。将提取液于 2-8°C, 10000×g 离心 10min, 取上清检测;
- 6、**组织样本**: 用预冷的 PBS(0.01M,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 1 g 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, 可以对匀浆液进行反复冻融或超声破碎。最后将匀浆液于 2- 8°C, 10000×g 离心 5-10min, 取上清检测;
- 7、**其它生物标本**: 2- 8°C, 2500-3500×g 离心 20min, 仔细收集上清。

**样品外观**: 样品应清澈透明, 悬浮物应离心去除。

**样品保存**: 样品收集后尽快检测。若不能及时检测, 请按一次使用量分装, 冻存于-20°C(1 个月内检测), 或-80°C(6 个月内检测), 避免反复冻融。

### ※ 试剂准备

使用前将所有试剂置于室温或 37°C 温箱平衡 30 分钟左右。

**洗涤液配制：**如果洗涤液 (20×) 有晶体析出，需在 37°C 下加热至晶体全部溶解。用蒸馏水 1:20 稀释 (例如：1mL 浓缩洗涤液加入 19mL 的蒸馏水)。

**标准品重溶：**用标准品复溶液重溶标准品，将一瓶标准品复溶液全部加入到一瓶标准品冻干粉中，上下颠倒数次混匀 (不可剧烈震荡产生大量气泡)，然后静置 10 分钟左右，重溶后得到品母液 STD，浓度为 40ng/mL。

**标准品倍比稀释：**准备 6 个试管，随后在 6 个试管中分别加入 500μL 的 1×标准品稀释液，在这 6 个单独的试管中将重溶后标准品母液 STD1 依次 2 倍倍比稀释，共得到 6 个浓度的标准品，依次为：20ng/mL、10ng/mL、5ng/mL、2.5ng/mL、1.25ng/mL、0.625ng/mL。具体稀释方法如图所示。以样本稀释液作为空白对照孔(0ng/mL)。



稀释后各管中标准品浓度如下(单位：ng/mL)

| STD | STD1 | STD2 | STD3 | STD4 | STD5 | STD6  |
|-----|------|------|------|------|------|-------|
| 40  | 20   | 10   | 5    | 2.5  | 1.25 | 0.625 |

**备注：**如待测样本中 CLOCK 浓度高于标准品最高值，请根据实际情况对样品进行适当稀释。

## ※ 实验步骤

### 所有标准品、样品建议复孔检测

1. **酶标板准备:** 确定实验所需要的孔数, 取下其它不使用的板条放入密封袋;
2. **样本孵育:** 首先在所有孔加入 50 $\mu$ L 样本稀释液, 然后在标准孔分别加入 50 $\mu$ L 不同浓度的标准品, 空白孔再加 50 $\mu$ L 样本稀释液, 样本孔加入 50 $\mu$ L 待测样品, 盖上封板膜, 37 $^{\circ}$ C 反应 1 h。孵育结束后, 每孔加入 200 $\mu$ L 1 $\times$ 洗涤缓冲液, 轻轻晃动 30 秒, 甩干, 以这种方式清洗 3 次后拍干;
3. **抗体孵育:** 每孔加入 100 $\mu$ L 生物素化抗体, 盖上封板膜, 37 $^{\circ}$ C 反应 1h。孵育结束后, 重复步骤 2 中的清洗方式清洗 3 次后拍干;
4. **酶标试剂孵育:** 每孔加入 100 $\mu$ L HRP 标记亲和素, 盖上封板膜, 37 $^{\circ}$ C 避光反应 30min, 重复步骤 2 中的清洗方式清洗 4 次, **在新的吸水纸上拍干;**
5. **底物显色:** 每孔加入 100 $\mu$ L 底物显色液 TMB, 盖上封板膜, 37 $^{\circ}$ C 避光反应 15 分钟。注意观察显色过程, 如果加入显色液后 STD1 孔颜色较深, 待 STD6 孔出现轻微蓝色时即可提前终止显色;
6. **终止反应:** 待显色反应结束后, 每孔加入 50 $\mu$ L 终止液, 轻轻晃动酶标板混匀, 10 分钟内用酶标仪在 450nm 处测吸光值。

## ※ 结果的计算

计算标准品和样本复孔的平均 OD 值并减去空白孔的 OD 值作为校正值。以浓度为横坐标, OD 值为纵坐标, 在坐标纸上绘出四参数逻辑函数的标准曲线(作图时去掉空白组的值)。或者使用能够生成四参数逻辑 (4-P) 曲线拟合的计算机软件来创建标准曲线。若样品 OD 值高于标准曲线上限, 应适当稀释后重测并在计算样本浓度时乘以相应的稀释倍数。

### ※ 示例数据

以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验数据建立标准曲线。

|                  |       |       |       |       |       |       |       |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 标准品浓度<br>(ng/mL) | 20    | 10    | 5     | 2.5   | 1.25  | 0.625 | 0     |
| OD 值             | 2.701 | 1.534 | 0.795 | 0.422 | 0.221 | 0.135 | 0.036 |
| 校正 OD 值          | 2.665 | 1.498 | 0.759 | 0.386 | 0.185 | 0.099 | 0     |



本图所示标准曲线仅供示例，结果计算应以同次试验标准品所绘标准曲线为准计算样本结果。

### 精密度

板内，板间变异系数均<10%。

板内精密度：在同一块板上重复检测三个已知浓度的样品 20 次，计算浓度的变异系数 (CV)。

板间精密度：在三块板子上对三个已知浓度的样品分别进行 20 次重复检测，计算浓度的变异系数 (CV)。

| 样本             | 板内精密度 |      |      | 板间精密度 |      |      |
|----------------|-------|------|------|-------|------|------|
|                | 1     | 2    | 3    | 1     | 2    | 3    |
| 数量             | 20    | 20   | 20   | 20    | 20   | 20   |
| 平均值<br>(ng/mL) | 1.29  | 2.37 | 4.81 | 1.17  | 2.64 | 4.9  |
| 标准差            | 0.02  | 0.05 | 0.17 | 0.03  | 0.07 | 0.15 |
| 变异系数<br>(%)    | 1.69  | 2.09 | 3.44 | 2.2   | 2.52 | 3.16 |

### 回收率

分别往不同样本中添加已知浓度的人 CLOCK，做回收实验，得出回收率范围和平均回收率。

| 样本类型       | 范围 (%) | 平均回收率 (%) |
|------------|--------|-----------|
| 血清(n=8)    | 90-98  | 95        |
| 血浆(n=8)    | 93-103 | 95        |
| 细胞培养物(n=8) | 96-117 | 100       |

### 灵敏度

经样本测试，本试剂盒的检测灵敏度为 0.15ng/mL。

### 线性关系

将高浓度人CLOCK加入样本中，在标准曲线范围内分别稀释2倍，4倍，8倍，16倍做回收实验，得出回收率及平均回收率。

|       |           | 血清 (n=4) | 细胞培养物(n=4) |
|-------|-----------|----------|------------|
| 1: 2  | 回收率范围 (%) | 95-114   | 94-108     |
|       | 平均回收率 (%) | 96       | 99         |
| 1: 4  | 回收率范围 (%) | 98-114   | 96-110     |
|       | 平均回收率 (%) | 103      | 105        |
| 1: 8  | 回收率范围 (%) | 104-117  | 102-116    |
|       | 平均回收率 (%) | 106      | 113        |
| 1: 16 | 回收率范围 (%) | 109-119  | 104-123    |
|       | 平均回收率 (%) | 113      | 119        |

### 特异性

该试剂盒测定可识别重组人 CLOCK。

其他相关蛋白在稀释缓冲液中制备为 50ng/mL，并测定交叉反应性。没有观察到明显的交叉反应。