

Human CCL2/MCP-1 ELISA Kit

产品编号	产品名称	包装
PC130	Human CCL2/MCP-1 ELISA Kit	96次

产品简介:

- 碧云天的Human CCL2/MCP-1 ELISA Kit (Human Monocyte Chemoattractant Protein1 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay Kit), 即人单核细胞趋化蛋白酶联免疫吸附检测试剂盒, 是一种用于特异性地高灵敏地定量检测人血清、血浆或细胞培养上清液中的MCP-1的ELISA试剂盒。
- 本产品检测灵敏度高, 特异性强, 重复性好。多次重复检测结果表明, 最小检出量为12.3pg/ml, 与人MCP-2、MCP-3、MCP-4、小鼠MCP-1、MCP-5、MARC等均没有交叉反应, 板内、板间变异系数均小于10%。
- 单核细胞趋化蛋白(Monocyte Chemoattractant Protein-1, MCP-1), 又称CCL2、MCAF和TDCF, 是一种分子量在10-14kDa之间的肝素结合蛋白, 属于CC趋化因子家族。目前至少有26个CC家族成员, 分子量在8-12kDa之间, 其中的大多数的编码基因都位于人17号染色体上, 且都具有3- β -折叠/1- α -螺旋结构。成熟的人MCP-1是由99个氨基酸的前体蛋白剪切掉23个氨基酸的信号肽后所剩余的76个氨基酸肽段组成。成熟的MCP-1包括受体结合区和N端的二聚体区, 外加糖胺聚糖(glycosaminoglycan, GAG)结合的羧基端。MCP-1会发生O连接的糖基化反应, 高度糖基化的MCP-1半衰期有所延长, 而低糖基化的MCP-1则具有更高的生物活性。MCP-1主要以单体形式存在, 并且单体MCP-1具有完整的趋化活性, 而二聚体或多聚体的MCP-1则被认为是游离细胞与血管内皮之间的一种连接物。人MCP-1与小鼠JE属于种间同源基因, 区别是小鼠JE多了一个49个氨基酸的羧基端。成熟的MCP-1与小鼠JE具有57%的氨基酸同源性, 与猪MCP-1具有79%的氨基酸同源性。内皮细胞、单核细胞、成纤维细胞、血管平滑肌细胞、肥大细胞和星形胶质细胞等多种细胞均能产生分泌MCP-1。
- MCP-1一共有三种G蛋白偶联受体: CCR2、CCR4和D6/CCBP2, 其中D6/CCBP2并不能发挥信号传递功能, 被认为是MCP-2的诱骗受体。CCR2具有两种亚型: CCR2A和CCR2B, 二者在其细胞质区域和表达细胞类别上有明显差异。CCR2A主要表达在T细胞和平滑肌细胞上, 无法激活Ca²⁺通道, 而CCR2B主要表达在单核细胞和活化的NK细胞上, 并且能够激活Ca²⁺通道。CCR4在多种造血细胞上都有表达。MCP-1最重要的特性是其对细胞的趋化活性, 当内皮细胞分泌MCP-1后, MCP-1与细胞表面的肝素分子结合, 形成低聚物, 形成CCR2结合位点, 与表达CCR2的循环单核细胞结合。炎症部位的一些细胞也能分泌MCP-1, 当MCP-1分泌后会发挥其趋药性, 这一过程还伴随着白细胞来源的MMPs分泌。当白细胞到达炎症部位后, 新分泌的MMPs可以作用于MCP-1, 抑制炎症反应发展。
- 多项动物实验表明MCP-1在炎症过程中具有重要作用。抑制MCP-1的活性能够减少实验动物内毒素血症、延迟性过敏反应和炎症性关节炎的发生, 相反当MCP-1过度表达时会增强淋巴细胞和单核细胞的招募。部分研究结果还表明MCP-1缺陷的小鼠在肺部感染、中风、血管损伤、肾小管损伤、自身免疫疾病、眼色素层炎和伤口恢复时期会表现出对炎症相关巨噬细胞、单核细胞、NK细胞和 $\gamma\delta$ T细胞的抑制。人体中MCP-1水平的升高通常都伴随着败血症、节段性回肠炎、狼疮性肾炎、肌萎缩性脊髓侧所硬化症、风湿、急性胰腺炎和动脉粥样硬化等疾病。在胃癌、食管鳞状细胞癌、恶性胶质瘤、卵巢癌、胰腺癌、膀胱癌和乳腺癌中, MCP-1的表达也会有所升高。
- MCP-1与CCR2受体结合后能够激活多种信号通路, MCP-1能通过活化Smad3和p42/44 MAPK及PI3K/AKT通路影响肿瘤细胞的迁移和存活, 通过CCR2依赖性的ERK1/ERK2/JNK-AP1和NF- κ B信号通路影响糖尿病患者的情况。
- 本试剂盒采用双抗体夹心ELISA法(Sandwich ELISA)检测样品中人MCP-1的浓度, 其原理见图1。人MCP-1特异的单克隆捕获抗体已预包被于酶标板上, 当加入标准品或样品时, 其中的人MCP-1会与捕获抗体结合。当加入生物素化的抗人MCP-1抗体后, 生物素化抗人MCP-1抗体与人MCP-1结合, 形成夹心的免疫复合物。随后加入辣根过氧化物酶标记Streptavidin(HRP-Streptavidin), 由于生物素与链霉亲和素(Streptavidin)可以特异性地结合, 因此链霉亲和素连接的HRP就会与夹心的免疫复合物连接起来而被固相捕获。最后加入显色剂TMB溶液, 固相捕获的辣根过氧化物酶就会催化无色的显色剂氧化成蓝色物质, 在加入终止液后呈黄色。通过酶标仪检测450nm处的吸光度值就能实现定量检测。人MCP-1浓度与A450值呈正比, 通过绘制标准曲线, 对照样品吸光度值, 即可计算出样品中人MCP-1浓度。

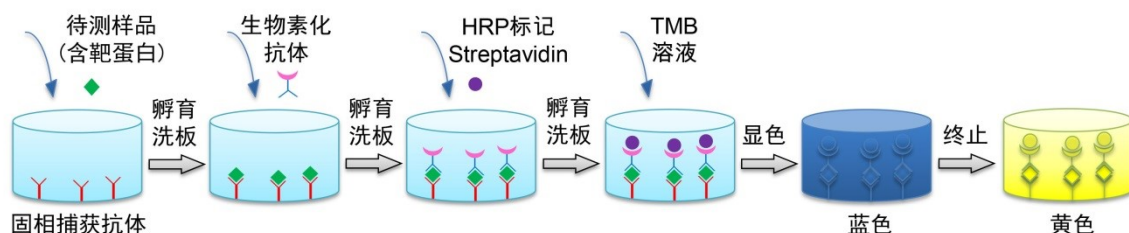


图1. 双抗体夹心ELISA原理图。

➤ 一个包装的本试剂盒，包括标准品检测，可以进行96次检测。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
PC130-1	人CCL2/MCP-1抗体预包被板	8孔×12条
PC130-2	样品分析缓冲液	5ml
PC130-3	标准品稀释液	10ml
PC130-4	人CCL2/MCP-1标准品	2-4瓶
PC130-5	人CCL2/MCP-1生物素化抗体	10ml
PC130-6	辣根过氧化物酶标记Streptavidin	10ml
PC130-7	洗涤液(20X)	30ml
PC130-8	TMB溶液	10ml
PC130-9	终止液	5ml
PC130-10	封板膜(透明)	2张
PC130-11	封板膜(白色)	2张
—	说明书	1份

保存条件：

标准品4℃保存，1-2周内有效，-20℃保存6个月内有效；试剂盒其他组分4℃保存6个月内有效。除标准品外，试剂盒其他组分严禁冻存

注意事项：

- 由于标准品一般是冻干粉，在制备后需要严格校准，所以标准品的瓶数及每瓶标准品所需加入的稀释液体积请以实际收到的试剂盒及标准品标签上的标注为准。
- 洗涤液(20X)在低温下可能有结晶，如果发现结晶，请室温水浴加热使结晶完全溶解后再配制工作液。
- 为保证标准品的精确性，标准品配制使用后，如果有剩余请勿再次使用。
- TMB溶液请勿接触氧化剂和金属，否则容易失效。
- 加样时，请注意每个样品或标准品必须更换枪头，一方面避免交叉污染，另一方面也避免吸取体积的误差。
- 由于本试剂盒均经过独立测试，所以请勿混用不同货号 and 不同批次的试剂盒组分，即使是同种试剂盒不同批次的试剂盒组分也不能混用。多个试剂盒同时检测时，请独立使用各个试剂盒中的试剂，请勿使用不同试剂盒中相同名称的组分。
- 充分混匀对保证反应结果的精确性很重要，在加液后请轻轻晃动整个96孔板，以保证混匀。
- 本试剂盒很多操作在室温进行，要求严格控制室温在25-28℃。温度低于25℃会导致最终检测到的吸光度显著下降。
- 洗涤过程非常重要，洗涤不充分会使精确度下降并导致结果误差较大。
- 检测标准品和样品时建议设置重复孔，以确保检测结果的可信度。
- 加样过程中须避免气泡的产生。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 样品准备

a. 样品的准备请按下列流程进行操作：

(a) 细胞上清样品离心取上清即可(如100-500g，5分钟)。

(b) 对于血清样品，将全血在室温下放置30分钟至2小时，不要剧烈摇晃以免溶血，待全血自然凝固并析出血清后，4℃约1000-2000g离心10分钟，取黄色上清即得血清，注意不要吸取白色或淡黄色沉淀。制备好的血清需置于冰上待用。

(c) 对于血浆样品，采集的全血建议使用EDTA进行抗凝处理，混匀后置冰上，4℃约1000-2000g离心10分钟，取黄色或淡黄色上清即得血浆，注意不要吸取白色沉淀。制备好的血浆需置于冰上待用。

(d) 若待测样品不能及时检测，样品制备后请分装，冻存于-20℃或-80℃，并注意避免反复冻融。

b. 血清样品不应添加任何防腐剂或抗凝剂。

c. 样品应清澈透明，检测前样品中如有悬浮物应通过离心去除。

d. 请勿使用溶血、高血脂或污染的样品检测，否则结果将不准确。

注：血清或血浆样品需要用样品分析缓冲液倍比稀释后再检测。

2. 检测前准备工作

a. 试剂盒从冰箱中取出后应置室温(25-28℃)平衡20分钟；每次检测后剩余试剂请及时置于4℃保存。

b. 配制适当量的洗涤液：将洗涤液(20X)用双蒸水或去离子水稀释至1X，例如10ml洗涤液(20X)加190ml水混匀后即为1X的洗涤液。

c. 按标准品标签上标注的体积加入标准品稀释液至1瓶标准品中，室温孵育15分钟(为确保标准曲线的准确性，切勿缩短孵育时间)。

育时间)。随后轻轻混匀并用移液枪吹打几次使标准品彻底溶解，使标准品终浓度达到1000pg/ml。通常每个浓度的标准品需要检测2个孔，每个孔的标准品用量为100 μ l，共需200 μ l，同时稀释时还需要使用250 μ l，因此如果1瓶标准品配制后的体积不足0.45ml，请使用更多瓶数的标准品，并在合并混匀后使用。

- d. 取5个洁净的1.5毫升离心管，每管预先加入250 μ l的标准品稀释液，并参考图2进行标准品的倍比稀释，最终得到1000、500、250、125、62.5、31.25pg/ml共六个标准品浓度，最后将稀释好的标准品依次加入预包被板孔中，标准品稀释液直接加入作为0pg/ml浓度，共七个标准品浓度。

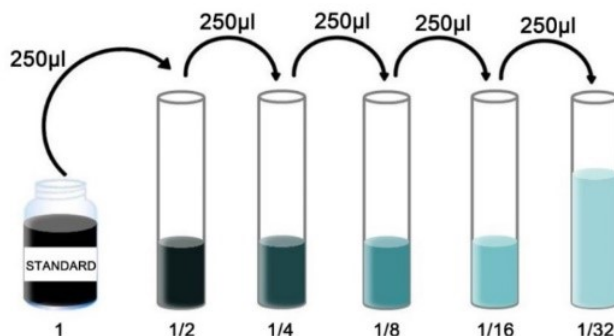


图2. 标准品倍比稀释示意图。按标准品(STANDARD)标签上标注体积加入标准品稀释液溶解并混匀后的浓度为标准品的起始浓度。其它的倍比稀释后的浓度依次为起始浓度的1/2、1/4、1/8、1/16和1/32。

3. 洗涤方法

自动洗板机或手工洗板：每孔洗涤液为300 μ l，注入与吸出间隔15-30秒。洗板5次。最后一次洗板完成后将板倒扣在厚吸水纸上适当用力拍干。

4. 实验过程需自备的材料和仪器

- 不同规格的移液枪及相应的吸头
- 酶标仪
- 自动洗板机(如果没有也可以手工洗板)
- 去离子水或双蒸水

5. 操作步骤

- 计算并确定一次实验所需的预包被板条数，取出所需板条放置在96孔框架内，暂时用不到板条请放回铝箔袋密封，保存于4 $^{\circ}$ C。
- 每次实验都需配制标准品并绘制出标准曲线，同时建议设置本底校正孔，即空白孔，设置方法为该孔只加TMB溶液和终止液。
- 分别将样品或不同浓度标准品按照100 μ l/孔加入相应孔中，用封板膜(透明)封住反应孔，室温孵育120分钟。对于血清或血浆样品的MCP-1检测，可以加入50 μ l样品分析缓冲液后加50 μ l样品；如稀释比例大，将样品与样品分析缓冲液等量加入，不足部分用标准品稀释液补充至100 μ l。请注意记录好样品的稀释倍数。

注意：请先查阅相关文献确定样品中待检测蛋白的大致浓度，如果该浓度大于或者小于本试剂盒的最高或者最低标准品浓度，请适当稀释或浓缩后再进行检测。

- 洗板5次，且最后一次置于厚吸水纸上拍干。
- 加入生物素化抗体100 μ l/孔(注：此生物素化抗体已经预先配制好，可以直接使用，不必再进行稀释)。用封板膜(透明)封住反应孔，室温孵育60分钟。
- 洗板5次，且最后一次置于厚吸水纸上拍干。
- 加入辣根过氧化物酶标记Streptavidin 100 μ l/孔(注：此辣根过氧化物酶标记Streptavidin已经预先配制好，可以直接使用，不必再进行稀释)。用封板膜(白色)封住反应孔，室温避光孵育20分钟。室温偏低时(低于25 $^{\circ}$ C)，需要适当延长孵育时间。
- 洗板5次，且最后一次置于厚吸水纸上拍干。
- 加入显色剂TMB溶液100 μ l/孔，用封板膜(白色)封住反应孔，室温避光孵育15-20分钟。室温偏低时需要适当延长孵育时间，此时可以孵育至标准品出现非常显著的颜色变化，若样品浓度足够高也会出现显著的颜色变化。
- 加入终止液50 μ l/孔，混匀后立即测量A450值。

6. 结果分析

- 复孔的值通常在20%的差异范围内结果才有效，复孔平均值可作为测量值。
- 每个标准品或样品的吸光度值应减去本底校正孔的吸光度值(如果没有做校正孔，则不需要减去)。
- 绘制标准曲线。以标准品浓度为横坐标，A450值为纵坐标，以平滑线连接各标准品的坐标点。通过样品的吸光度值和标准曲线计算出样品的相应浓度。

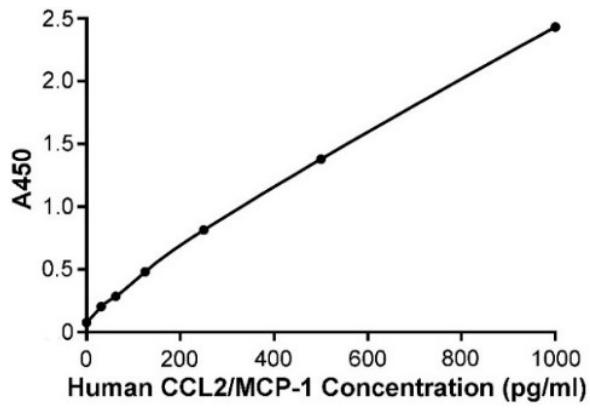


图3. Human CCL2/MCP-1 ELISA Kit的标准曲线。实测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

d. 若样品OD值高于标准曲线上限，应适当稀释后重新测定，计算浓度时需注意乘以样品的稀释倍数。

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
PC125	Mouse CCL2/JE/MCP-1 ELISA Kit	96次
PC128	Rat CCL2/JE/MCP-1 ELISA Kit	96次
PC130	Human CCL2/MCP-1 ELISA Kit	96次

Version 2023.03.01