

# 人C反应蛋白酶联免疫吸附测定试剂盒

Human C-Reactive Protein/CRP ELISA Kit

本产品需冰袋运输。保存于4℃，保质期6个月；保存于-20℃，保质期12个月。

## 产品参数

|      |                       |
|------|-----------------------|
| 货号   | HJ023                 |
| 规格   | 96次                   |
| 检测范围 | 0.78 ng/mL~50 ng/mL   |
| 敏感性  | 34 pg/mL              |
| 特异性  | 系统和其它因子无交叉反应          |
| 样本类型 | 人血清、血浆、体液、组织匀浆或细胞培养上清 |

## 产品简介

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法检测样品中人 CRP 的浓度。人 CRP 捕获抗体已经预包被于酶标板上,当加入样品或标准品时,其中的人 CRP 会与捕获抗体结合,而其它游离成分则会通过洗涤被除去。接着,再加入生物素标记的人 CRP 抗体后,抗人 CRP 抗体与人 CRP 接合,形成夹心的免疫复合物,其它游离成分则通过洗涤被除去。随后加入酶复合物,生物素与酶复合物特异性结合,这样酶复合物上的 HRP 就与夹心的免疫复合物连接起来,而其它游离成分则通过洗涤被除去。最后加入显色剂,若样品中存在人 CRP,则会形成免疫复合物,其上连接的 HRP 会催化无色的显色剂氧化生成蓝色物质,而后加入终止液,最终产物呈黄色。通过酶标仪检测,读取 450 nm 处的 OD 值,人 CRP 浓度与 OD450 值之间呈正比,通过检测标准品绘制标准曲线,对照未知样品中 OD 值,即可计算出样品中人 CRP 的浓度。

## 背景简介

C - 反应蛋白 (C-reactive protein, 简称 CRP) 是一种在机体受到感染或组织损伤时血浆中急剧上升的蛋白质,也称为急性蛋白。CRP 可以激活补体和加强吞噬细胞的吞噬作用,清除入侵机体的病原微生物和损伤、坏死、凋亡的组织细胞,在机体的天然免疫过程中发挥重要的保护作用。

CRP 与磷脂胆碱残基具有高度亲和力,并且可以和多种自身配体或外来配体相结合,激活补体活化的经典途径,但限制补体激活晚期炎症反应的发展及强度。CRP 还具有和 IgG 及补体相似的调理和凝集作用,增强巨噬细胞对各种细菌和异物的吞噬功能,从而减少由于外来抗原暴露所带来的异常免疫反应。



## 产品内容

| 组分                  | 体积或数量                |
|---------------------|----------------------|
| 人CRP预包被板            | 8孔条×12个              |
| 样品稀释液               | 30 mL                |
| 重组人CRP标准品(冻干)       | 2支(50 ng/支)          |
| 生物素标记人CRP抗体         | 130 $\mu$ L(效价1:100) |
| 抗体稀释液               | 12 mL                |
| 酶复合物(HRP标记的链霉亲和素)   | 130 $\mu$ L(效价1:100) |
| 酶复合物稀释液             | 12 mL                |
| 浓缩洗涤液(25 $\times$ ) | 30 mL                |
| 显色剂TMB              | 10 mL                |
| 终止液                 | 10 mL                |
| 封板胶纸                | 4张                   |

## 操作步骤

### 样品制备

#### 1. 根据样品种类选择相应的处理方法：

- A. **细胞上清**：将细胞培养上清液100~500 $\times g$ 离心5 min，去除悬浮物后即可；
- B. **血清样品**：将全血在室温下静置0.5~2 h，待其自然凝固并析出血清后，离心取黄色上清即可(4 $^{\circ}$ C, 1,000~2,000 $\times g$ , 10 min)，注意请勿吸取沉淀，制备好的血清需置于冰上待用，请勿在其中添加任何防腐剂或抗凝剂；
- C. **血浆样品**：使用EDTA对全血进行抗凝处理后，混合均匀置于冰上，离心取黄色上清即可(4 $^{\circ}$ C, 1,000~2,000 $\times g$ , 10 min)，注意请勿吸取沉淀，制备好的血浆需置于冰上待用；
- D. **组织匀浆/体液**：离心去除沉淀即可。

注意：① 若待测样品无法及时检测，样品制备完成后，请分装冻存于-20 $^{\circ}$ C，避免反复冻融；  
② 请保证待测样品清澈透明，检测前如发现样品中有悬浮物，需通过离心去除；  
③ 为了保证检测结果准确，请勿使用溶血、黄疸、高血脂或污染的样品。

#### 2. 稀释样品

查阅相关文献，预估样品中待测因子的含量，从而确定适当的稀释倍数，使稀释后样品中待测因子的浓度处于 ELISA 试剂盒的最佳检测范围。根据待测因子含量的不同，分别采取不同的稀释方案：

- ① 待测因子含量在 500~5,000 ng/mL 范围内，一般按 1:100 稀释，即向 297  $\mu$ L 样品稀释液中加入 3  $\mu$ L 样品；
- ② 待测因子含量在 50~500 ng/mL 范围内，一般按 1:10 稀释，即向 225  $\mu$ L 样品稀释液中加入 25  $\mu$ L 样品；
- ③ 待测因子含量在 0.78~50 ng/mL 范围内，一般按 1:2 稀释，即向 100  $\mu$ L 样品稀释液中加入 100  $\mu$ L 样品；
- ④ 待测因子含量 $\leq$ 0.78 ng/mL，样品一般无需稀释。

以上方案仅供参考，实验中请详细记录样品的稀释方法。



### 检测准备工作

3. 试剂盒自 4℃冰箱取出后,请置于室温平衡 20 min; 如从 -20℃取出,各组分需彻底融化后再平衡 20 min; 检测完成后,剩余试剂请及时置于 4℃或 -20℃保存;
4. 将 **浓缩洗涤液(25×)** 用双蒸水或去离子水稀释成1×洗涤液;
5. 重组人CRP标准品的稀释和使用(在使用前2 h内准备, 室温操作, **请严格控制在25~28℃**)
  - ① 配制 50 ng/mL 标准品: 取 1 mL 样品稀释液加入标准品管内,盖好后静置 15 min 以上,然后反复颠倒 / 搓动以助溶解;
  - ② 按下表将 50 ng/mL 标准品用样品稀释液进行倍比梯度稀释。(最高浓度为 50 ng/mL,将标准品稀释液作为浓度 0 ng/mL。)

| 管号 | 稀释液用量(μL) | 复溶后标准品用量(μL) | 标准品的最终浓度(ng/mL) |
|----|-----------|--------------|-----------------|
| A  | 0         | 1,000        | 50              |
| B  | 300       | 300(从A管中取)   | 25              |
| C  | 300       | 300(从B管中取)   | 12.5            |
| D  | 300       | 300(从C管中取)   | 6.25            |
| E  | 300       | 300(从D管中取)   | 3.12            |
| F  | 300       | 300(从E管中取)   | 1.56            |
| G  | 300       | 300(从F管中取)   | 0.78            |
| H  | 300       | 0            | 0               |

**注意:** 标准品复溶加样后, 剩余部分请丢弃。

6. 准备生物素标记人 CRP 抗体工作液
  - ① 按每孔需添加 100 μL 抗体工作液, 计算其总用量 (为弥补操作中的损耗, 需多配制 100~200 μL);
  - ② 按 1 μL **生物素标记人 CRP 抗体** 添加 99 μL **抗体稀释液** 的比例配制工作液, 轻轻混匀。
7. 准备酶复合物工作液 (需在使用前 1 h 内准备)
  - ① 按每孔需添加 100 μL 酶复合物工作液, 计算其总用量 (为弥补操作中的损耗, 需多配制 100~200 μL);
  - ② 按 1 μL **酶复合物** 添加 99 μL **酶复合物稀释液** 的比例配制工作液, 轻轻混匀。

### 检测流程

8. 通过计算确定一次实验所需的板条数, 取出所需板条放置于框架内, 多余的板条请放回铝箔袋密封, 保存于4℃或-20℃;  
**注意:** ① **标准品和样品建议做双复孔检测;**  
② **每次实验均需绘制标准曲线。**
9. 将用样品稀释液稀释后的样品和不同浓度标准品 (100 μL/ 孔 ) 分别加入相应孔中, 用封板胶纸封住反应孔, 37℃孵育 90 min;  
**注意:** ① **请查阅相关文献确定样品中待检测蛋白的大致浓度, 若其大于本试剂盒标准曲线的最大标准品浓度, 请将样品适当稀释后再进行检测;**  
② **整个加样过程不宜超过 10 min, 否则可能会影响检测结果。**
10. 甩去酶标板内液体, 无需洗板, 将板倒扣在吸水纸上拍干;
11. 加入稀释后的生物素标记人 CRP 抗体工作液 (100 μL/ 孔 ), 用封板胶纸封住反应孔, 37℃孵育 60 min;

12. 洗板 5 次, 每孔  $1\times$  洗涤液用量为 300  $\mu\text{L}$ , 注入与吸出间隔 15~30 s, 洗完后将板倒扣在吸水纸上拍干;  
注意: 洗涤过程至关重要, 洗涤不充分会导致结果产生较大误差。
13. 加入稀释后的酶复合物 (100  $\mu\text{L}$ /孔), 用封板胶纸封住反应孔,  $37^{\circ}\text{C}$  避光孵育 30 min;
14. 洗板 5 次, 方法同步骤 12;
15. 加入 显色剂 TMB (100  $\mu\text{L}$ /孔), 用封板胶纸封住反应孔, 避光  $37^{\circ}\text{C}$  反应 10~25 min;  
注意: ① 在保存和使用时, 请勿将 TMB 接触氧化剂和金属;  
② 因实验室条件差异, 最佳显色时间会有所不同, 反应充分时肉眼可见标准品的前 3~4 孔有明显的梯度蓝色。
16. 加入 终止液 (100  $\mu\text{L}$ /孔), 混匀后即刻使用酶标仪测量 OD450, 同时设定 540 nm 或 570 nm 作为校正波长, 即可计算得到校正吸光度值 (OD450-OD540 或 OD450-OD570);  
注意: 读取 OD 值建议在 10 min 内完成。

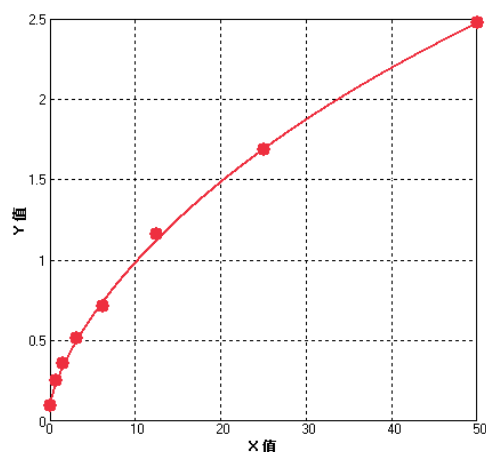
## 数据分析

17. 绘制标准曲线。以标准品浓度作横坐标, OD 值作纵坐标, 利用计算机软件作四参数逻辑 (4-PL) 曲线拟合创建标准曲线, 通过样品的 OD 值即可在标准曲线上计算出其相应浓度。  
注意: ① 复孔 OD 值在 20% 的差异范围内结果才有效, 复孔 OD 值取平均后可作为测量值;  
② 若样品 OD 值高于标准曲线上限, 应适当稀释后重测, 计算浓度时应乘以稀释倍数。

## 标准曲线范例

人CRP参考标准曲线

| 标准品浓度      | O.D.  |
|------------|-------|
| 0 ng/mL    | 0.099 |
| 0.78 ng/mL | 0.249 |
| 1.56 ng/mL | 0.360 |
| 3.12 ng/mL | 0.513 |
| 6.25 ng/mL | 0.712 |
| 12.5 ng/mL | 1.160 |
| 25 ng/mL   | 1.686 |
| 50 ng/mL   | 2.476 |



注意: 本图仅供参考, 应以同次试验标准品所绘标准曲线计算样品含量。

## 注意事项

1. 浓缩洗涤液 低温情况下可能会出现结晶, 请水浴加热使结晶完全溶解后再配制工作液;
2. 严禁混用不同批号试剂盒的组分;
3. 加样过程请避免产生气泡, 实验操作过程中一定要保证试剂充分混匀, 否则会使结果产生较大误差;
4. 说明书中提到的室温条件, 请严格控制在  $25\sim 28^{\circ}\text{C}$ ;
5. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作;
6. 本产品仅限科研使用。