

人A1BG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: KE00130
规格: 96T
灵敏度: 21.5 pg/mL
检测范围: 125 - 4000 pg/mL
用途: 此试剂盒用于定量检测血清、血浆以及细胞上清中人A1BG浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

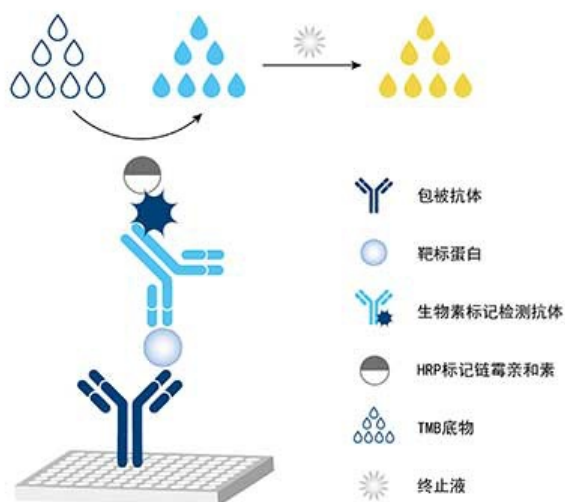
目录

- 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 8
 - 9.5 灵敏度 8
 - 9.6 线性 8
- 十：参考文献 9

一：背景信息

Alpha-1B-糖蛋白(A1BG)是一种血浆蛋白，该蛋白由五个重复的结构域组成，与已知的免疫球蛋白的重链和轻链具有高度的同源性，因此被认为是免疫球蛋白超家族成员。Alpha-1B-糖蛋白主要在肝脏中产生，随后会分泌到血浆中，该蛋白在血浆中的正常水平约为0.22 mg/mL。据报道，富含半胱氨酸的分泌蛋白3(CRISP-3)是Alpha-1B-糖蛋白特异性及高亲和力的配体。Alpha-1B-糖蛋白-CRISP-3复合物可能在抑制蛇毒金属蛋白酶或肌毒素的毒性过程中起作用。此外，Alpha-1B-糖蛋白还可能与乳腺癌、肝癌、胰腺癌、膀胱癌、类风湿性关节炎及类固醇抵抗性肾病综合征等疾病相关。

二：检测原理



◀双抗夹心模式图 (检测抗体标记生物素)

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 *	4000 pg/瓶	2 瓶
Detection antibody, biotinylated (100×)	生物素标记检测抗体浓缩液 (100×) **	120 µL/支	1 支
Streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) (100×)	HRP标记链霉亲和素浓缩液 (100×) **	120 µL/支	1 支
Sample Diluent PT 1-af	样本稀释液 PT 1-af	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
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℃条件下存放6个月或者在-20℃条件下存放1年 2：已开启试剂盒可在2-8℃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℃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)。
- 6.3 细胞上清：收集细胞培养液，500×g 离心5 min取上清，立即使用或分装后-20℃存放，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℃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标记链霉亲和素（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标记的链霉亲和素浓缩液（100×）加 990μL 抗体稀释液进行配制，轻轻混匀。

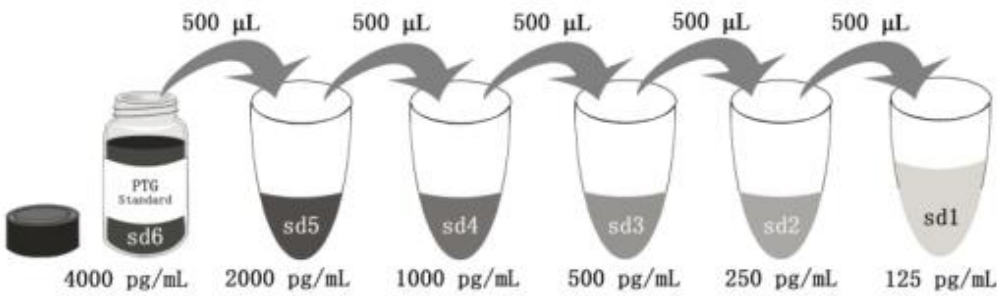
7.4 待检测样本：

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1:160000稀释；人血浆1:80000稀释；细胞上清1:2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：

用1mL PT 1-af 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
# μL of Sample Diluent PT 1-af	1000 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL
	"sd7"	"sd6"	"sd5"	"sd4"	"sd3"	"sd2"

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标记链霉亲和素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2h；

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1h；

8.6 重复步骤8.4；

8.7 每孔加 100 μL HRP标记链霉亲和素（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；

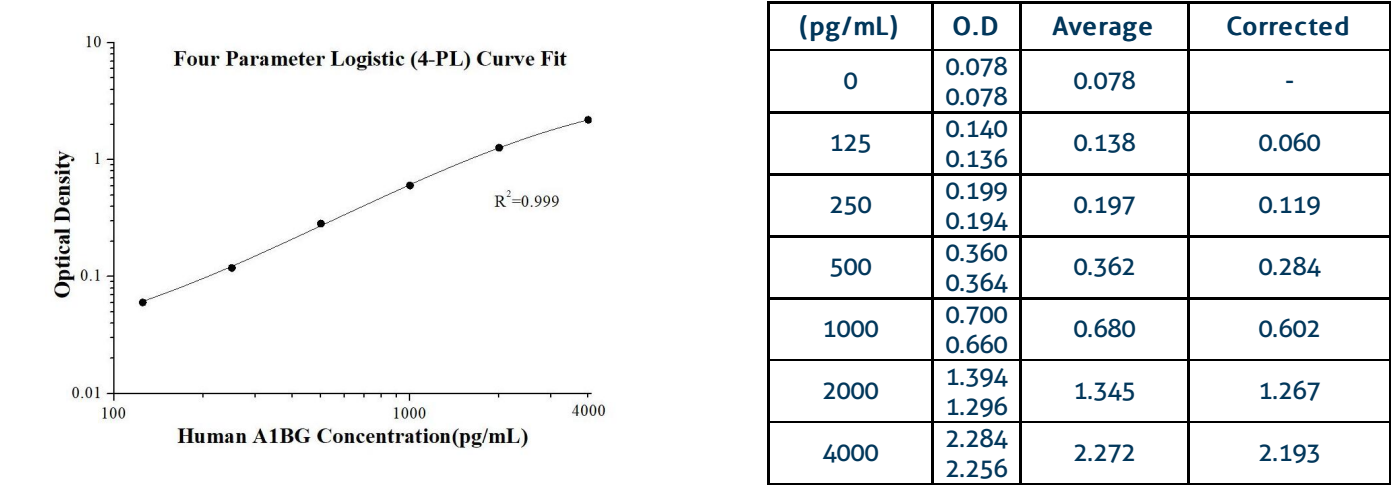
8.12 数据分析：每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

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标记链霉亲和素 (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



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)					板间精密度 (CV 间)				
样本	数量	平均值 (pg/mL)	标准差	变异系数CV%	样本	数量	平均值 (pg/mL)	标准差	变异系数CV%
1	20	257.9	14.7	5.7	1	24	266.1	21.2	8.0
2	20	517.3	23.3	4.5	2	24	504.5	35.8	7.1
3	20	2,133.3	107.2	5.0	3	24	2,072.8	105.0	5.1

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A1BG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	1:80000	101	81-122
	1:160000	101	77-121
人血清	1:160000	110	99-125
	1:320000	98	90-108
细胞上清	1:2	96	80-108
	1:4	99	80-111

9.4 样本值

应用本试剂盒，检测健康人的血浆样本中人A1BG的浓度。

样本类型	均值 (µg/mL)	范围 (µg/mL)
人血浆 (n=24)	132	74-560

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A1BG的灵敏度为 21.5 pg/mL。

9.6 线性

细胞上清加入高浓度的人A1BG蛋白，梯度稀释后检测样本加标线性，人血浆、人血清用对应样本稀释液稀释样本，使稀释后的检测值处于标曲范围内，线性数据如下：

(人血浆样本预先稀释10000倍，人血清样本预先稀释20000倍)

稀释倍数		人血浆	人血清	细胞上清
1:2	均值 (%)	100	100	80
	范围 (%)	-	-	72-96
1:4	均值 (%)	102	100	83
	范围 (%)	89-110	97-103	73-94
1:8	均值 (%)	96	106	87
	范围 (%)	88-109	104-106	76-95
1:16	均值 (%)	91	97	84
	范围 (%)	84-100	97	78-96

十：参考文献

1. Ishioka N, et al. Amino acid sequence of human plasma alpha 1B-glycoprotein: homology to the immunoglobulin supergene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83(8):2363-7 (1986).
2. Udby L, et al. Cysteine-rich secretory protein 3 is a ligand of alpha1B-glycoprotein in human plasma. *Biochemistry*. 43(40):12877-86 (2004).
3. Abdul-Rahman PS, et al. Expression of high-abundance proteins in sera of patients with endometrial and cervical cancers: analysis using 2-DE with silver staining and lectin detection methods. *Electrophoresis*. 28(12):1989-96 (2007).
4. Jeong DH, et al. Plasma proteomic analysis of patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *J Gynecol Oncol*. 19(3):173-80 (2008).
5. Liu Y, et al. Integrative proteomics and tissue microarray profiling indicate the association between overexpressed serum proteins and non-small cell lung cancer. *PLoS One*. 7(12):e51748 (2012).