

## 人PCSK9/Proprotein Convertase 9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: KE00181

规格: 96T

灵敏度: 0.01 ng/mL

检测范围: 0.156 - 10 ng/mL

用途: 此试剂盒用于定量检测血清、血浆、细胞上清以及细胞裂解液中人PCSK9/Proprotein Convertase 9浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

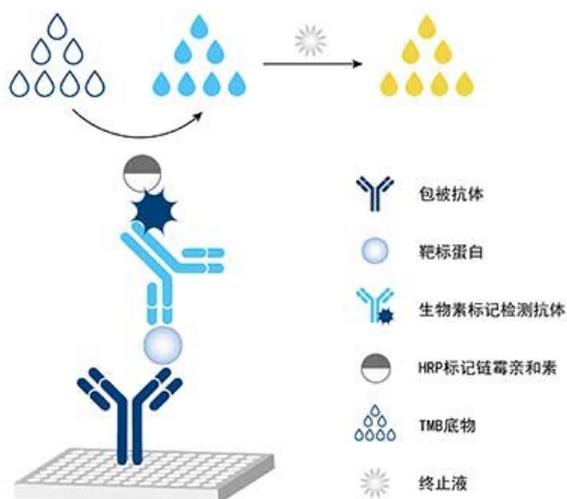
# 目录

一：背景信息	3
二：检测原理	3
三：试剂盒组分及储存	3
四：试剂盒组分及储存	4
五：实验注意事项	4
六：样本准备	5
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	8
9.3 加标回收率	8
9.4 样本值	8
9.5 灵敏度	9
9.6 线性	9
十：参考文献	9

## 一：背景信息

PCSK9, 也称为 NARC1 和 PC9, 属于肽酶 S8 家族。PCSK9 由多种组织表达和分泌, 但主要由肝脏、小肠和肾脏 (PMID 28587771) 表达和分泌。它可能与皮质神经元的分化有关, 并可能在胆固醇稳态中发挥作用。PCSK9 是 LDL 受体和血浆胆固醇浓度的调节剂 (PMID: 26293463)。

## 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 *	10 ng/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-ec	样本稀释液 PT 1-ec (用于人血清、血浆以及细胞上清样本)	30 mL/瓶	1 瓶
Sample Diluent PT 3-ec	样本稀释液 PT 3-ec (用于细胞裂解液样本)	30 mL/瓶	1 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
<b>储存条件：</b> 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°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°C存放，避免反复冻融。

6.4 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。

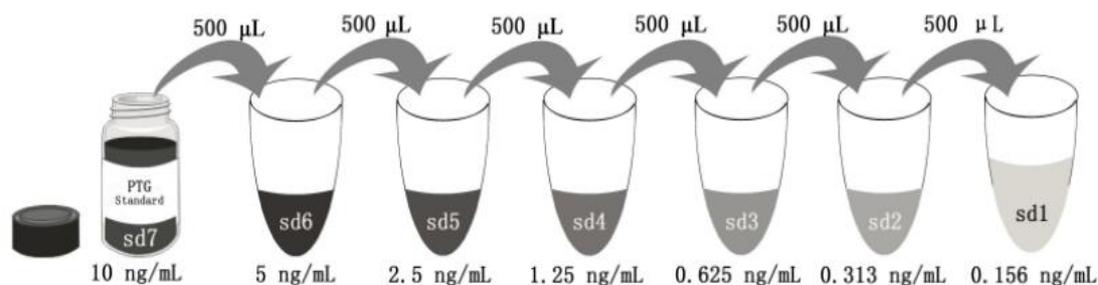
### 7.4 待检测样本：

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1:40或1:80稀释；细胞上清样本1:20或1:40稀释；细胞裂解液样本1:10或1:20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、血浆以及细胞上清样本，使用1 mL PT 1-ec样本稀释液复溶标准品；检测细胞裂解液样本，使用1 mL PT 3-ec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-ec or PT 3-ec	1000 µL	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；

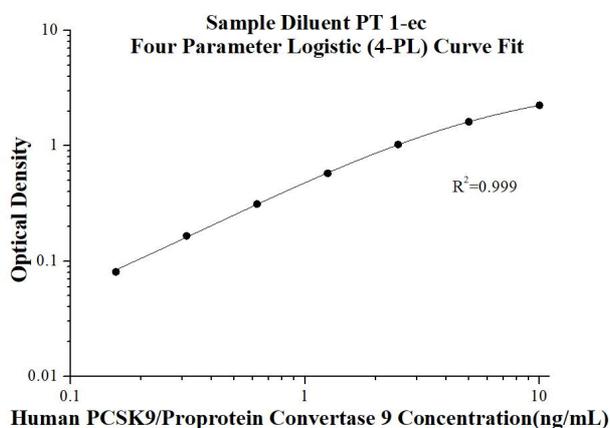
8.12 数据分析：每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD值为纵坐标，使用专业软件(如Origin、ELISACalc等)进行四参数拟合(4-PL)，根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

操作流程如下：

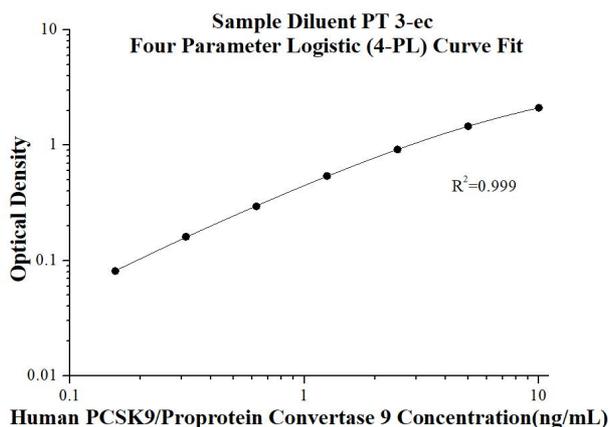
步骤	试剂	体积	孵育时间	洗涤次数	孵育温度
1	标准品或样本	100 $\mu$ L	120 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
2	检测抗体 (1 $\times$ )	100 $\mu$ L	60 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
3	HRP标记链霉亲和素 (1 $\times$ )	100 $\mu$ L	40 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
4	显色 TMB	100 $\mu$ L	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37°C孵育，避光
5	终止液	100 $\mu$ L	0 分钟	不需要洗涤	-
6	加入终止液后以630 nm为校正波长，在450 nm处测量OD值，此过程建议不超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

## 九：实验参数

### 9.1 参考标曲图



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.040 0.038	0.039	-
0.156	0.122 0.117	0.120	0.080
0.313	0.208 0.201	0.204	0.165
0.625	0.350 0.351	0.350	0.311
1.25	0.611 0.620	0.615	0.576
2.5	1.077 1.054	1.065	1.026
5	1.659 1.646	1.652	1.613
10	2.313 2.252	2.282	2.243



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.046 0.045	0.045	-
0.156	0.127 0.126	0.126	0.081
0.313	0.208 0.204	0.206	0.160
0.625	0.341 0.339	0.340	0.294
1.25	0.581 0.590	0.585	0.540
2.5	0.956 0.966	0.961	0.915
5	1.501 1.507	1.504	1.458
10	2.123 2.180	2.151	2.105

## 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 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%	样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%
1	20	4.66	0.15	3.1	1	24	4.91	0.23	4.6
2	20	1.26	0.02	1.9	2	24	1.26	0.05	3.8
3	20	0.31	0.01	3.4	3	24	0.27	0.02	6.7

## 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PCSK9/Proprotein Convertase 9的加标回收率实验，结果如下：

样本类型	稀释倍数	均值 (%)	范围 (%)
人血清	1:80	96	91-105
	1:160	89	82-92
细胞上清	1:40	86	79-95
	1:80	88	79-104
细胞裂解液	1:20	105	86-115
	1:40	104	87-111

## 9.4 样本值

应用本试剂盒，检测来自健康人的血清、血浆中的人PCSK9/Proprotein Convertase 9的浓度。

样本类型	均值 (ng/mL)	范围 (ng/mL)
人血清 (n=16)	67.2	13.1-155.5
人血浆 (n=16)	101.7	9.2-287.2

**细胞上清：**在含有 10% 胎牛血清、2.5 mM L-谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素和 100 µg/mL 硫酸链霉素的 DMEM 培养基中培养人肝细胞癌细胞HepG2，收集细胞上清，检测人PCSK9/Proprotein Convertase 9的浓度为 60.1 ng/mL。

**细胞裂解液：**

	HepG2 裂解液
PCSK9 /总蛋白 (ng/mg)	3.6

## 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PCSK9/Proprotein Convertase 9的灵敏度为0.01 ng/mL。

## 9.6 线性

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：

(人血清样本预先稀释20倍，细胞上清样本预先稀释10倍，细胞裂解液样本预先稀释5倍)

稀释倍数		人血清 (样本稀释液PT 1-ec)	细胞上清 (样本稀释液PT 1-ec)	细胞裂解液 (样本稀释液PT 3-ec)
1:2	均值 (%)	100	100	100
	范围 (%)	-	-	-
1:4	均值 (%)	94	95	93
	范围 (%)	89-98	94-97	88-97
1:8	均值 (%)	88	92	94
	范围 (%)	84-94	88-95	86-107
1:16	均值 (%)	94	91	81
	范围 (%)	91-97	88-97	78-86

## 十：参考文献

1. Zhu YM. et al. (2015) Arterioscler Thromb Vasc Biol.35(10):2254-2259.
2. Melendez QM. et al. (2017) Arch Biochem Biophys. 625-626:39-53.
3. Li JJ, Li S. et al. (2015) Medicine (Baltimore). 94(52):e2426.