

## 人SERPINE1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: KE00109

规格: 96T

灵敏度: 0.16 ng/mL

检测范围: 0.313 - 20 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SERPINE1浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

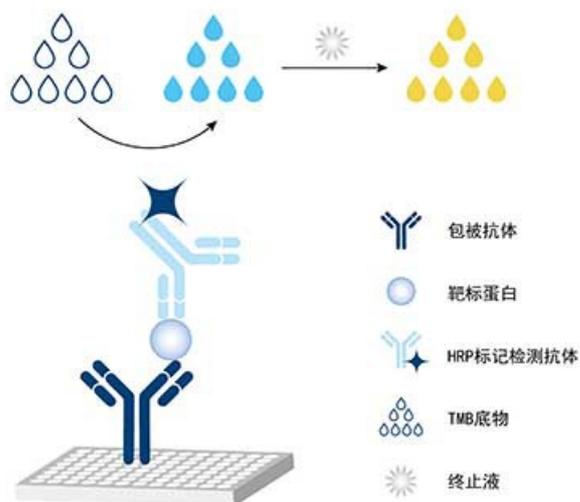
# 目录

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	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

SERPINE1, 也称为纤溶酶原激活剂抑制剂 1 型 (PAI-1), 是丝氨酸蛋白酶抑制剂 (SERPIN) 超家族的成员。它由血管内皮、肝脏、单核细胞/巨噬细胞、血小板和脂肪组织产生。高血浆 PAI-1 水平与患心血管疾病的风险增加有关。它与肥胖、胰岛素抵抗和 2 型糖尿病的发病机制有关。在几种肿瘤类型中, SERPINE1 表达上调, 并被描述为不良预后标志物。除了其预后价值, SERPINE1 表达已被验证为淋巴结阴性乳腺癌患者治疗决策的标志物。该基因的缺陷是导致纤溶酶原激活物抑制剂-1 缺乏症 (PAI-1 缺乏症) 的原因, 高浓度的基因产物与血栓形成倾向有关。

## 二：检测原理



### ◀双抗夹心模式图 (检测抗体直标HRP)

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 *	20 ng/瓶	2 瓶
Detection antibody, HRP-conjugated (100×)	HRP标记检测抗体浓缩液 (100×) **	120 μL/支	1 支
Sample Diluent PT 4	样本稀释液 PT 4 (用于人血清、血浆样本)	30 mL/瓶	1 瓶
Sample Diluent PT 1	样本稀释液 PT 1 (用于细胞上清、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

**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。
- 6.4 细胞裂解液：收集细胞后，用预冷(2-8℃)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℃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 HRP标记检测抗体 (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 HRP标记检测抗体浓缩液 (100×) 加 990 μL 抗体稀释液进行配制, 轻轻混匀。

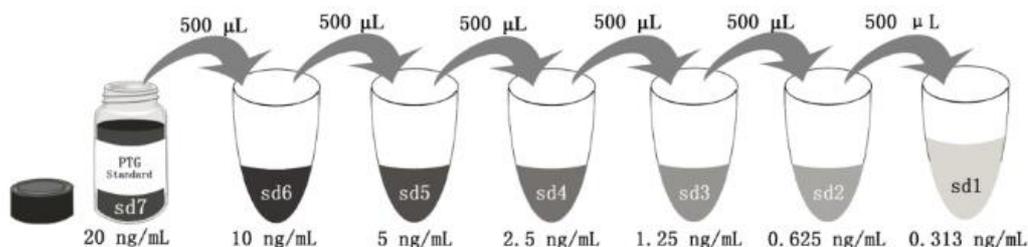
### 7.3 待检测样本：

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、血浆1:80或1:160稀释; 细胞上清1:16或1:32稀释; 细胞裂解液1:8或1:16稀释。样品采集、处理和储存的差异可能导致测值的改变。

### 7.4 梯度稀释的标准品：

检测人血清、血浆样本, 使用1 mL PT 4 样本稀释液复溶标准品。检测细胞上清、细胞裂解液样本, 使用1 mL PT 1 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 4 or PT 1	<b>1000 μL</b>	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 (HRP标记 检测抗体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  $\mu$ L,余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本100  $\mu$ L/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1 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 $\times$ )洗涤板条,每孔350-400  $\mu$ L,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  $\mu$ L HRP标记检测抗体(1 $\times$ )(参照试剂准备部分7.2),盖上封板膜,37°C孵育40 min;

8.6 重复步骤8.4;

8.7 显色:每孔加TMB显色液100  $\mu$ L,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);

8.8 终止:每孔加终止液100  $\mu$ L,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)

8.9 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;

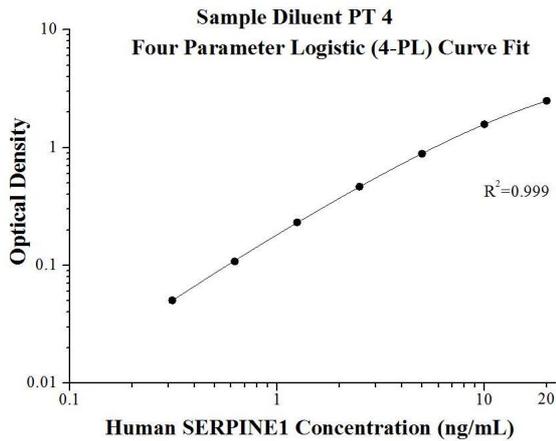
8.10 数据分析:每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值,设置复孔,取其平均值。以标准品的浓度为横坐标,OD值为纵坐标,使用专业软件(如Origin、ELISACalc等)进行四参数拟合(4-PL),根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度,乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

操作流程如下:

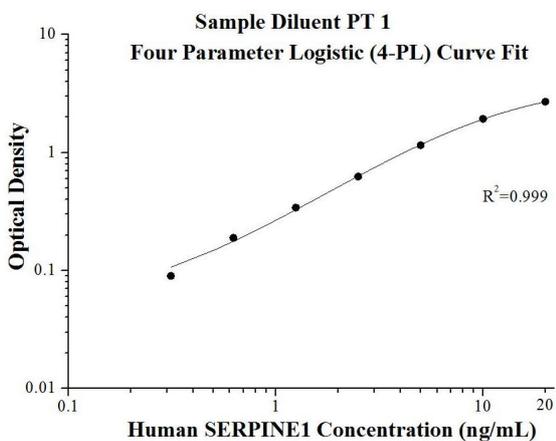
步骤	试剂	体积	孵育时间	洗涤次数	孵育温度
1	标准品或样本	100 $\mu$ L	60 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
2	HRP标记检测抗体(1 $\times$ )	100 $\mu$ L	40 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
3	显色 TMB	100 $\mu$ L	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37°C孵育,避光
4	终止液	100 $\mu$ L	0 分钟	不需要洗涤	-
5	加入终止液后以630 nm为校正波长,在450 nm处测量OD值,此过程建议不超过5分钟				

## 九：实验参数

### 9.1 参考标曲图



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.077 0.086	0.081	-
0.313	0.137 0.127	0.132	0.05
0.625	0.192 0.187	0.19	0.108
1.25	0.311 0.315	0.313	0.231
2.5	0.547 0.549	0.548	0.467
5	0.964 0.969	0.967	0.885
10	1.67 1.646	1.658	1.577
20	2.58 2.564	2.572	2.49



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.069 0.074	0.072	-
0.313	0.165 0.158	0.162	0.09
0.625	0.257 0.264	0.261	0.189
1.25	0.406 0.42	0.413	0.341
2.5	0.698 0.696	0.697	0.625
5	1.204 1.244	1.224	1.152
10	1.979 2.017	1.998	1.926
20	2.735 2.789	2.762	2.69

### 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)				
样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%
1	20	1.0	0.05	4.8
2	20	4.8	0.06	1.3
3	20	17.6	0.43	2.4

板间精密度 (CV间)				
样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%
1	24	1.4	0.04	2.6
2	24	5.2	0.13	2.5
3	24	18.4	0.36	1.9

### 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SERPINE1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	1:300	84	72-98
	1:600	85	74-99
人血清	1:160	87	79-98
	1:320	85	77-98
细胞上清	1:30	91	84-98
	1:60	89	88-91
细胞裂解液	1:16	87	80-95
	1:32	89	87-93

### 9.4 样本值

血清/血浆：

应用此试剂盒检测人血清、血浆样本中人SERPINE1浓度，结果如下：

样本类型	均值 (ng/mL)	范围 (ng/mL)
人血浆(n=15)	341.1	17.5-512.9
人血清 (n=16)	304.8	173.3-415.2

细胞上清：

HepG2 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 中培养。收集细胞上清，检测人 SERPINE1 的浓度为 38.6 ng/mL。

A549 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 中培养。收集细胞上清，检测人 SERPINE1 的浓度为 63.8 ng/mL。

HUVEC 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中培养。收集细胞上清，检测人 SERPINE1 的浓度为 465.4 ng/mL。

细胞裂解液：

	A549 裂解液	HUVEC 裂解液
SERPINE1 /总蛋白 (ng/mg)	4.7	11.7

## 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SERPINE1的灵敏度为0.16 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、血浆样本预先稀释10倍；细胞上清样本预先稀释2倍)

稀释倍数		人血浆 (样本稀释液PT 4)	人血清 (样本稀释液PT 4)	细胞上清 (样本稀释液PT 1)	细胞裂解液 (样本稀释液PT 1)
1:2	均值 (%)	95	100	95	84
	范围 (%)	93-98	95-103	94-96	82-85
1:4	均值 (%)	104	100	98	99
	范围 (%)	104-105	100-101	96-100	92-106
1:8	均值 (%)	100	100	101	100
	范围 (%)	99-101	100-101	100-103	100-101
1:16	均值 (%)	98	99	105	106
	范围 (%)	98-99	97-102	103-108	97-114

## 十：参考文献

1. Huang J. et al.(2012). Blood. 20: 4873-81.
2. Kohler HP. et al. (2000). N Engl J Med. 342: 1792-801.
3. Festa A. et al. (2006). Circulation. 113: 1753-9.
4. Look MP. et al. (2002). J Natl Cancer Inst. 16;94(2):116-28.
5. Ulisse S. et al. (2009). Curr Cancer Drug Targets. 9(1):32-71.