

## Speedy™ 人ADAMTS13一步法ELISA检测试剂盒

请在实验前仔细阅读本说明书

产品货号: SE50236  
规格: 96T  
灵敏度: 27.8 pg/mL  
检测范围: 78.1-5000 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的人ADAMTS13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    | 8 |
| 9.3 加标回收率  | 8 |
| 9.4 样本值    | 8 |
| 9.5 灵敏度    | 8 |
| 9.6 线性     | 9 |
| 9.7 特异性    | 9 |
| 十：参考文献     | 9 |

## 一：背景信息

具有血小板反应蛋白 1 型基序成员 13 (ADAMTS13) 的去整合素和金属蛋白酶是一种多结构域金属蛋白酶，迄今为止仅鉴定出一种底物。ADAMTS13 切割聚合物力传感器血管性血友病因子 (VWF)，该因子在剪切应力下展开并将血小板募集到血管损伤部位。在免疫介导的血栓性血小板减少性紫癜 (ITTP) 患者中，ADAMTS13 是一种罕见的危及生命的疾病，自身抗体可抑制其活性或促进其清除。在没有 ADAMTS13 的情况下，VWF 聚合物未得到充分加工，导致血小板自发粘附，表现为严重的、危及生命的微血管血栓形成。

## 二：检测原理



抗标签抗体预先包被于板孔，可结合带标签的捕获抗体。抗原或样本、捕获抗体及辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的检测抗体加入后，在溶液中形成夹心复合物。在 HRP 催化下，四甲基联苯胺 (TMB) 使底物溶液由无色变蓝，加入终止液后变黄。溶液颜色深浅与结合蛋白量成正比。测量波长为 450 nm，校正波长为 630 nm。

## 三：需自备的实验器材

- 3.1 酶标仪 (可读取 450nm 和 630nm 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，也可使用 Proteintech 公司数据分析网站：<https://www.ptgcn.com/products/elisa-kits/>；
- 3.8 微孔板恒温振荡器。

## 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 *            | 10000 pg/瓶 | 2 瓶 |
| Capture antibody (100×)                   | 捕获抗体浓缩液 (100×) **       | 60 μL/支    | 1 支 |
| Detection antibody, HRP-conjugated (100×) | HRP 标记检测抗体浓缩液 (100×) ** | 60 μL/支    | 1 支 |
| Sample Diluent PT 4B1                     | 样本稀释液 PT 4B1            | 30 mL/瓶    | 1 瓶 |
| Detection Diluent                         | 抗体稀释液                   | 15 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，详见7.4部分，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×) 的配制:

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1×洗涤液。

### 7.2 抗体混合液 (1×) 的配制:

开盖前瞬时离心, 将捕获抗体和检测抗体稀释分别按1:100比例稀释到同一管稀释液中, 配制成检测所需的工作液。例如: 将50 μL包被抗体浓缩液 (100×) 和50 μL检测抗体浓缩液 (100×) 加入 4900 μL抗体稀释液, 混匀配制成1×抗体混合液。

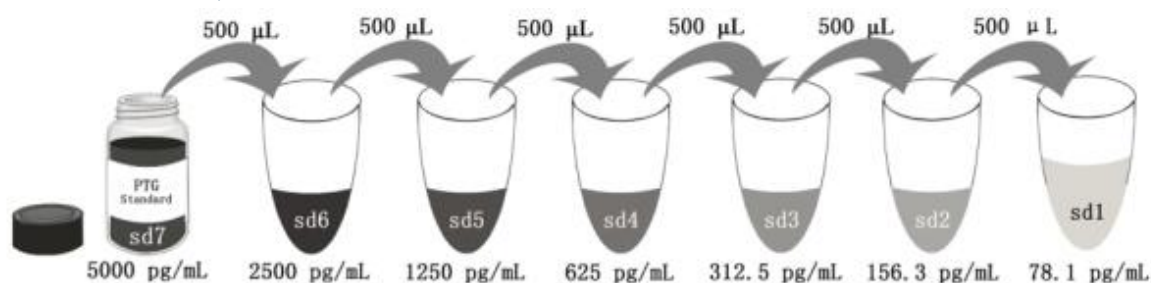
### 7.3 待检测样本:

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: 人血清和血浆样本1:200或1:400稀释; 细胞上清样本1:2或1:4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:

使用2mL PT 4B1 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 | 500 μL |
| # μL of Sample Diluent PT 4B1                     | 2000 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 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 (捕获抗体浓缩液和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50  $\mu$ L,余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本50  $\mu$ 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 每孔加50  $\mu$ L 抗体混合液(1 $\times$ )(参照试剂准备部分7.2),盖上封板膜,恒温振荡器上37°C 400 rpm 孵育 1 h(若无恒温振荡器,此步骤建议37°C静置孵育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 $\times$ )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;

8.5 显色:每孔加TMB显色液100  $\mu$ L,恒温振荡器上37°C 400 rpm 孵育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);

8.6 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)

8.7 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;

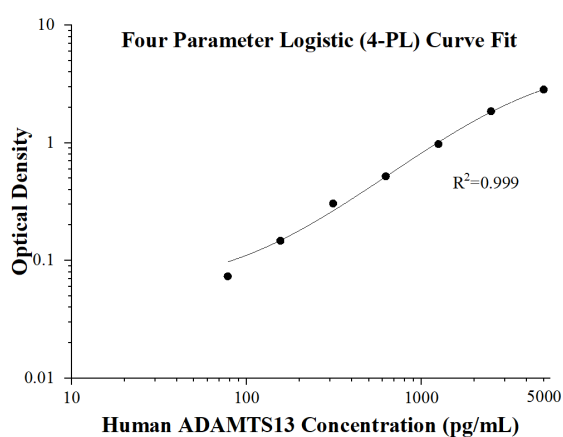
8.8 数据分析:每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值,设置复孔,取其平均值。以标准品的浓度为横坐标,OD值为纵坐标,使用专业软件(如Origin、ELISACalc等)进行四参数拟合(4-PL),根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度,乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

操作流程如下：



## 九：实验参数

### 9.1 参考标曲图



| (pg/mL) | O.D              | Average | Corrected |
|---------|------------------|---------|-----------|
| 0       | 0.0314<br>0.0306 | 0.0310  | -         |
| 78.1    | 0.1068<br>0.1019 | 0.1044  | 0.0734    |
| 156.3   | 0.1811<br>0.1752 | 0.1782  | 0.1472    |
| 312.5   | 0.3646<br>0.3088 | 0.3367  | 0.3057    |
| 625     | 0.5492<br>0.5525 | 0.5509  | 0.5199    |
| 1250    | 1.0247<br>0.989  | 1.0069  | 0.9759    |
| 2500    | 1.9769<br>1.7933 | 1.8851  | 1.8541    |
| 5000    | 2.8452<br>2.8952 | 2.8702  | 2.8392    |

## 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 8 次;

板间精密度: 3个不同浓度的样本在板间重复测定 16 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           | 8  | 2,476.5     | 60.1 | 2.4     | 1           | 16 | 2,403.2     | 100.1 | 4.2     |
| 2           | 8  | 631.0       | 14.0 | 2.2     | 2           | 16 | 608.2       | 25.7  | 4.2     |
| 3           | 8  | 315.4       | 5.3  | 1.7     | 3           | 16 | 309.0       | 14.9  | 4.8     |

## 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ADAMTS13的加标回收率实验, 结果如下:

| 样本类型 | 稀释倍数   | 平均值 (%) | 范围 (%) |
|------|--------|---------|--------|
| 人血浆  | 1:800  | 104     | 89-117 |
|      | 1:1600 | 114     | 98-127 |
| 细胞上清 | 1:2    | 97      | 93-101 |
|      | 1:4    | 99      | 95-103 |

## 9.4 样本值

人血浆 - 应用本试剂盒, 检测人血浆样本中人ADAMTS13的浓度。

| 样本类型       | 平均值 (ng/mL) | 范围 (ng/mL)  |
|------------|-------------|-------------|
| 人血浆 (n=16) | 526.9       | 423.4-781.9 |

细胞上清:

SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞在含有 10%胎牛血清、50  $\mu$ M  $\beta$ -巯基乙醇、2 mM L-谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL 硫酸链霉素的 RPMI 培养基中进行培养;

A431 细胞在添加了 10%胎牛血清、2.5 mM L-谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL 硫酸链霉素的 DMEM 培养基中进行培养;

取细胞培养上清液用于检测 ADAMTS13, 所有检测结果均低于最低标准值 78.1 pg/mL。

## 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ADAMTS13的灵敏度为 27.8 pg/mL。

## 9.6 线性

细胞上清加入高浓度的人ADAMTS13蛋白，梯度稀释后检测样本加标线性。人血浆样本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100倍。)

|      |        | 人血浆    | 细胞上清   |
|------|--------|--------|--------|
| 1:2  | 均值 (%) | 100    | 99     |
|      | 范围 (%) | -      | 88-109 |
| 1:4  | 均值 (%) | 90     | 95     |
|      | 范围 (%) | 84-95  | 92-98  |
| 1:8  | 均值 (%) | 101    | 101    |
|      | 范围 (%) | 96-106 | 98-105 |
| 1:16 | 均值 (%) | 102    | 100    |
|      | 范围 (%) | 97-107 | 99-101 |

## 9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人ADAMTS13，加入50 ng/mL以下细胞因子，无明显交叉反应。

Human:

ADAMTS1

TIMP-3

## 十：参考文献

1. Joly, B. et al. (2017). Blood. 129, 2836-2846.
2. Dong, J. et al. (2002). Blood. 100, 4033-4039.
3. Leebeek. et al. (2017). N. Engl. J. Med. 376, 701-702.
4. Crawley. et al. (2011). Blood. 118, 3212-3221.
5. Roose. et al. (2018). J. Thromb. Haemost. 16, 378-388.
6. Schelpe. et al. (2020). Blood. 136, 353-361.
7. South. et al. (2016). J. Thromb.Haemost. 14, 2011-2022