

人APOB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: KE00158
规格: 96T
灵敏度: 0.68 ng/mL
检测范围: 3.9 - 250 ng/mL
用途: 此试剂盒用于定量检测血清、血浆、细胞上清以及母乳中人APOB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 | 8 |
| 9.6 线性 | 9 |
| 十：参考文献 | 9 |

一：背景信息

载脂蛋白 B (APOB) 是一种血浆蛋白，主要在肝脏和肠道中合成，在脂质和胆固醇代谢中起重要作用。APOB 基因通过 mRNA 编辑编码两种不同的同种蛋白，APOB-48 和 APOB-100。APOB-100 仅由肝脏合成，对肝脏中 VLDL 的组装至关重要。APOB-48 仅由小肠合成，对肠内乳糜微粒的组装至关重要。APOB-48 和 APOB-100 共享一个共同的 N 端序列，APOB-48 缺乏 APOB-100 的 C 端 LDL 受体结合区。血浆 APOB 水平与冠心病有关。此 ELISA 试剂盒只适合检测 APOB-100，而不能识别 APOB-48。

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 * | 250 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、人血浆以及细胞上清样本) | 30 mL/瓶 | 2 瓶 |
| Sample Diluent PT 3 | 样本稀释液 PT 3 (用于母乳样本) | 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 |
| 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 母乳：收集样本后，在2-8℃条件下1000×g离心15 min，取澄清部分，重复此过程2次，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°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。

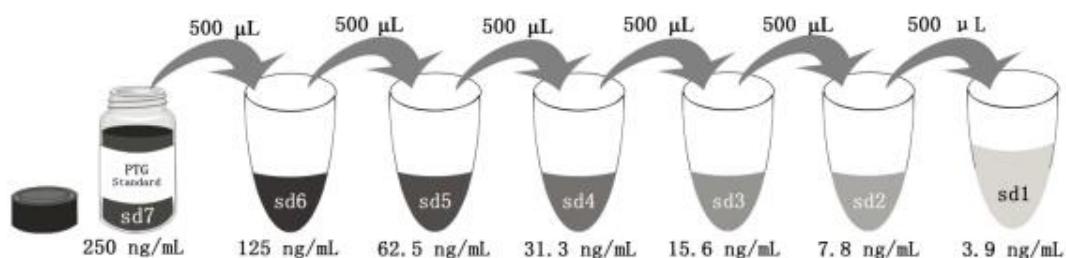
7.4 待检测样本：

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：人血清和人血浆 1:20000或1:40000稀释（人血清、人血浆先用含1% Triton-X 100的10mM PBS缓冲液稀释样品2倍，然后涡旋5秒，再用样本稀释液稀释至终浓度）；细胞上清1:2或1:4稀释，母乳样本1:50或1:100稀释；细胞上清和母乳不需要用1% Triton-X 100 缓冲液处理，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；检测母乳样本，使用1 mL PT 3 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 1-ec or PT 3 | 1000 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(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;

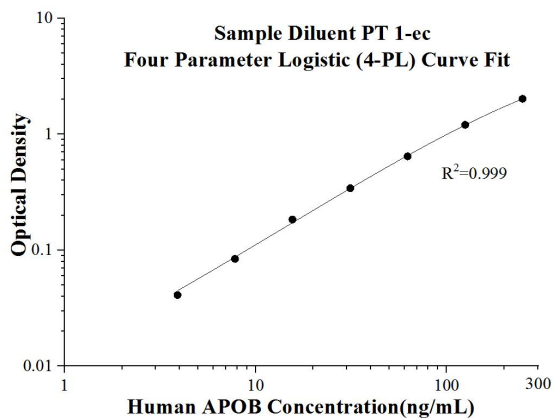
8.12 数据分析:每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值,设置复孔,取其平均值。以标准品的浓度为横坐标,OD 值为纵坐标,使用专业软件(如Origin、ELISACalc等)进行四参数拟合(4-PL),根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度,乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

操作流程如下:

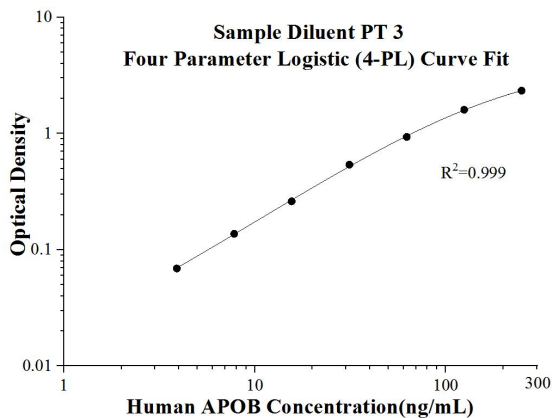
| 步骤 | 试剂 | 体积 | 孵育时间 | 洗涤次数 | 孵育温度 |
|----|--|--------|----------|-------|---------------|
| 1 | 标准品或样本 | 100 μL | 120 分钟 | 4 次 | 覆膜后37°C孵育 |
| 2 | 检测抗体 (1×) | 100 μL | 60 分钟 | 4 次 | 覆膜后37°C孵育 |
| 3 | HRP标记链霉亲和素 (1×) | 100 μL | 40 分钟 | 4 次 | 覆膜后37°C孵育 |
| 4 | 显色 TMB | 100 μL | 15-20 分钟 | 不需要洗涤 | 覆膜后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



| (ng/mL) | O.D | Average | Corrected |
|---------|----------------|---------|-----------|
| 0 | 0.088 0.082 | 0.085 | - |
| 3.9 | 0.131 0.121 | 0.126 | 0.041 |
| 7.8 | 0.170 0.167 | 0.169 | 0.084 |
| 15.6 | 0.275 0.262 | 0.269 | 0.184 |
| 31.3 | 0.420 0.434 | 0.427 | 0.342 |
| 62.5 | 0.727 0.732 | 0.73 | 0.645 |
| 125 | 1.303 1.276 | 1.29 | 1.205 |
| 250 | 2.092 2.113 | 2.103 | 2.018 |



| (ng/mL) | O.D | Average | Corrected |
|---------|----------------|---------|-----------|
| 0 | 0.108 0.108 | 0.108 | - |
| 3.9 | 0.178 0.175 | 0.177 | 0.069 |
| 7.8 | 0.247 0.243 | 0.245 | 0.137 |
| 15.6 | 0.375 0.363 | 0.369 | 0.261 |
| 31.3 | 0.651 0.643 | 0.647 | 0.539 |
| 62.5 | 1.026 1.058 | 1.042 | 0.934 |
| 125 | 1.701 1.711 | 1.706 | 1.598 |
| 250 | 2.450 2.439 | 2.445 | 2.337 |

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 | 119.9 | 4.1 | 3.4 |
| 2 | 20 | 28.3 | 0.7 | 2.6 |
| 3 | 20 | 7.2 | 0.4 | 5.4 |

| 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 | 133.3 | 9.8 | 7.3 |
| 2 | 24 | 31.0 | 2.4 | 7.9 |
| 3 | 24 | 8.0 | 0.8 | 10.0 |

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APOB的加标回收率实验，结果如下：

| 样本类型 | 稀释比例 | 均值 (%) | 范围 (%) |
|------|----------|--------|--------|
| 人血清 | 1:80000 | 94 | 80-109 |
| | 1:160000 | 96 | 77-121 |
| 细胞上清 | 1:2 | 104 | 94-114 |
| | 1:4 | 102 | 86-122 |
| 母乳 | 1:200 | 103 | 81-120 |
| | 1:400 | 100 | 75-122 |

9.4 样本值

应用本试剂盒，检测来自健康人的血清和母乳样本中的人APOB的浓度。

| 样本类型 | 均值 (ug/mL) | 范围 (ug/mL) |
|------------|------------|--------------|
| 人血清 (n=25) | 576.2 | 147.4-1966.7 |
| 母乳 (n=7) | 4.3 | 2.2-8.8 |

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APOB的灵敏度为0.68 ng/mL。

9.6 线性

细胞上清加入高浓度的人APOB蛋白，梯度稀释后检测样本加标线性，人血清和母乳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：

(血清样本预先1:10000稀释，母乳样本预先1:25稀释)

| 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) | 母乳 (样本稀释液PT 3) |
|------|--------|-----------------------|------------------------|-------------------|
| 1:2 | 均值 (%) | 100 | 106 | 100 |
| | 范围 (%) | - | 101-116 | - |
| 1:4 | 均值 (%) | 94 | 104 | 98 |
| | 范围 (%) | 86-104 | 99-108 | 92-103 |
| 1:8 | 均值 (%) | 91 | 98 | 101 |
| | 范围 (%) | 79-105 | 91-102 | 94-107 |
| 1:16 | 均值 (%) | 90 | 93 | 97 |
| | 范围 (%) | 81-113 | 83-104 | 76-118 |

十：参考文献

1. Wayne TF. et al. (1981). Atherosclerosis. 1981 Jun;39(3):411-24.
2. Walldius G. et al. (2004). Clin Chem Lab Med. 2004;42(12):1355-63.