

人ATF4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: KE00147
规格: 96T
灵敏度: 77.8 pg/mL
检测范围: 93.8 - 6000 pg/mL
用途: 此试剂盒用于定量检测细胞裂解液中人ATF4浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

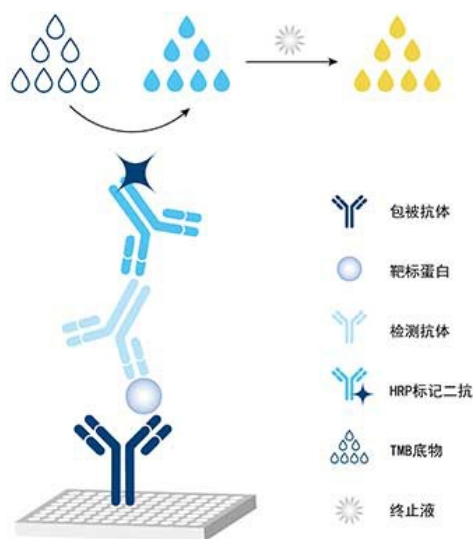
目录

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	8

一：背景信息

ATF4 是一种转录因子，其 C 端具有特殊的碱性亮氨酸拉链结构域，可以与其他蛋白发生互作形成聚合体结构；ATF4 基因位于人类第22号染色体，在正常情况下，ATF4 蛋白仅低水平表达；ATF4 在不同的组织器官和细胞中发挥不同的功能，在哺乳动物中，ATF4 参与多种生理活动，例如眼睛的发育、骨骼的形成、应激反应以及学习记忆等过程。ATF4 可以通过调控胰岛素的分泌及组织敏感性，从而在糖脂代谢、氨基酸代谢以及能量平衡等过程中发挥重要作用。ATF4 通过在肿瘤细胞中高表达维持肿瘤细胞的代谢稳态及存活，在肿瘤发展和浸润过程中发挥作用。除此以外，ATF4 在神经元的分化及形态发生过程中也具有重要意义，并且与多种神经退行性疾病相关，因此，它可能是治疗癌症的潜在靶标。

二：检测原理



◀双抗夹心模式图 (检测抗体不标记)

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 *	12000 pg/瓶	2 瓶
Detection antibody (100×)	检测抗体浓缩液 (100×) **	120 μL/支	1 支
HRP-conjugated antibody (100×)	HRP标记二抗浓缩液 (100×) **	120 μL/支	1 支
Sample Diluent PT 4	样本稀释液 PT 4	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 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 1×10^7 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 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标记二抗 (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标记二抗浓缩液 (100×) 加 990 μL 抗体稀释液进行配制, 轻轻混匀。

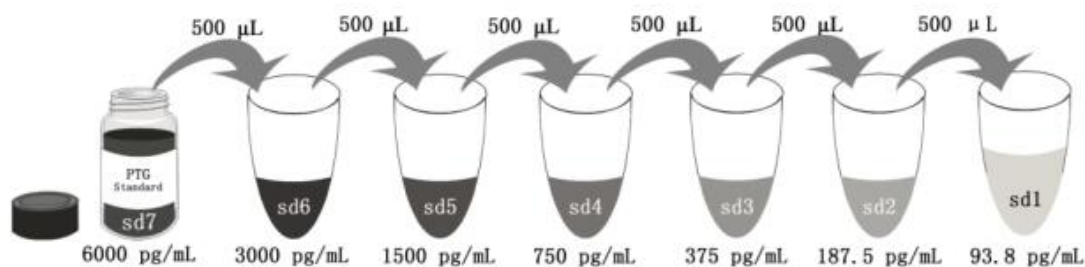
7.4 待检测样本：

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: 细胞裂解液样本建议1:4或1:8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2 mL PT 4 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 4	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(检测抗体浓缩液、HRP标记二抗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 酶标板上覆盖膜,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标记二抗(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;

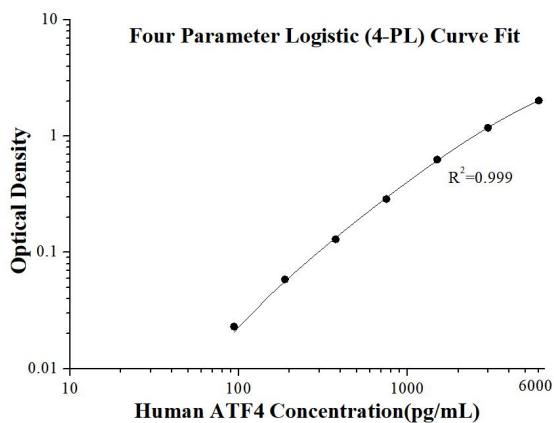
8.12 数据分析:每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值,设置复孔,取其平均值。以标准品的浓度为横坐标,OD 值为纵坐标,使用专业软件(如Origin、ELISACalc等)进行四参数拟合(4-PL),根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度,乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

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标记二抗(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



(pg/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.087 0.087	0.087	-
93.8	0.111 0.109	0.110	0.023
187.5	0.145 0.146	0.146	0.059
375	0.216 0.217	0.217	0.130
750	0.371 0.378	0.375	0.288
1500	0.730 0.699	0.715	0.628
3000	1.268 1.265	1.267	1.180
6000	2.097 2.120	2.109	2.022

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 (pg/mL)	标准差	变异系数CV%
1	20	279.9	18.0	6.4
2	20	878.4	44.9	5.1
3	20	3,600.8	170.7	4.7

板间精密度 (CV 间)				
样本	数量	平均值 (pg/mL)	标准差	变异系数CV%
1	24	290.2	24.1	8.3
2	24	883.5	56.3	6.4
3	24	3,553.9	139.6	3.9

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ATF4的加标实验，结果如下：

样本类型	稀释倍数	均值(%)	范围(%)
细胞裂解液	1:4	90	76-113
	1:8	103	70-107

9.4 样本值

人肝癌细胞 HepG2 (3.5×10^7 cells/mL) 在含有 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 硫酸链霉素的 DMEM 培养基中培养。细胞分别在未刺激或 1 μ M Thapsigargin (TG) 刺激下培养 5 小时。裂解细胞并测量总蛋白，测定人 ATF4 含量。

裂解液样本	ATF4 浓度 (pg/mL)	总蛋白 (mg/mL)
未刺激	740	2
1 μ M TG 刺激 5h	15731	2

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ATF4的灵敏度为77.8 pg/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：

(细胞裂解液样本预先稀释2倍)

稀释倍数		细胞裂解液
1:2	均值 (%)	100
	范围 (%)	-
1:4	均值 (%)	101
	范围 (%)	100-106
1:8	均值 (%)	98
	范围 (%)	97-98
1:16	均值 (%)	88
	范围 (%)	76-91

十：参考文献

1. Ghosh R, Lipson KL, Sargent KE, Mercurio AM, Hunt JS, et al. (2010) Transcriptional Regulation of VEGF-A by the Unfolded Protein Response Pathway. PLoS ONE 5(3): e9575. doi:10.1371/journal.pone.0009575
2. Su X, Chu Y, Kordower JH, Li B, Cao H, Huang L, et al. (2015) PGC-1 α Promoter Methylation in Parkinson's Disease. PLoS ONE 10(8): e0134087. doi:10.1371/journal.pone.0134087