

## 人Alpha-1-microglobulin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: KE01027

规格: 96T

灵敏度: 0.04 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、细胞上清以及尿液中的人Alpha-1-microglobulin浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

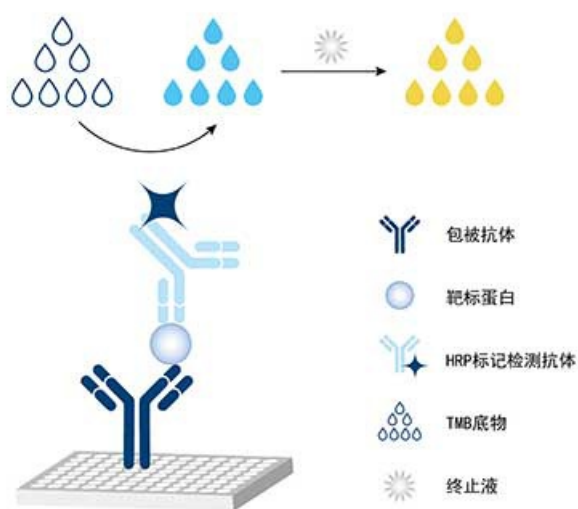
# 目录

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
9.7 特异性	8
十：参考文献	9

## 一：背景信息

$\alpha$ -1-微球蛋白 (Alpha-1-microglobulin, A1M) 又被称为HI30, Protein AMBP、Bikunin、Trypstatin和内源性 $\alpha$ -胰蛋白酶抑制剂轻链 (ITI-LC)。A1M 属于脂质结合蛋白家族, 这是一个包含具有相似单域结构的结构蛋白的类别, 这些蛋白存在于细菌、植物和动物体内。 $\alpha$ 1 微球蛋白是一种 27-30 千道尔顿的糖蛋白, 存在于各种体液中。它属于疏水性配体结合蛋白的脂质结合蛋白超家族, 形成内部配体结合口袋。该蛋白作为细菌与聚合物表面黏附的媒介, 并参与抑制肾脏结石的形成。A1M 被认为是一种具有强大细胞和组织保护特性的生理抗氧化剂。而 A1M 是一种血红素和自由基清除剂以及还原酶, 比库宁则是细胞外基质的结构成分, 具有蛋白酶抑制剂和抗炎特性。在人类中, A1M 大部分在肝脏中合成, 但身体中大多数其他细胞也会表达少量的 A1M。在血液中, 可以发现两种形式的 A1M 的等量存在: 一种是游离的单体形式, 另一种是与免疫球蛋白 A、白蛋白和凝血酶原结合形成的共价高分子量复合物。体内产生的 A1M 还被描述为广泛存在于皮肤的真皮和表皮层、合胞体滋养层细胞、单核细胞/巨噬细胞、血管内皮以及胎盘组织和细胞外基质的细胞外基质中。

## 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 4B1	样本稀释液 PT 4B1	30 mL/瓶	2 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°C条件下存放6个月或者在-20°C条件下存放1年  
2：已开启试剂盒可在2-8°C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 尿液：收集尿液后，1000×g离心20 min，取上清，立即使用或分装后-20°C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 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 990μL 抗体稀释液进行配制, 轻轻混匀。

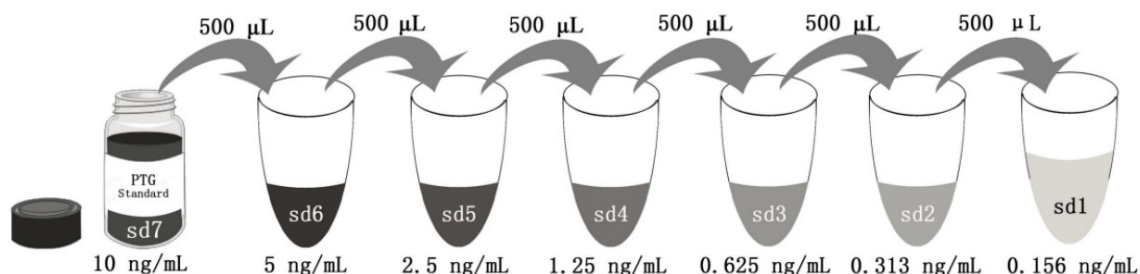
### 7.3 待检测样本：

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: 人血清和血浆样本1:3200或1:6400稀释; 细胞上清样本1:80或1:160稀释; 尿液样本1:400或1:800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2 mL 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	<b>2000 μL</b>	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20-30min（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 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 HRP标记检测抗体（1×）（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 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）；

8.8 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）

8.9 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；

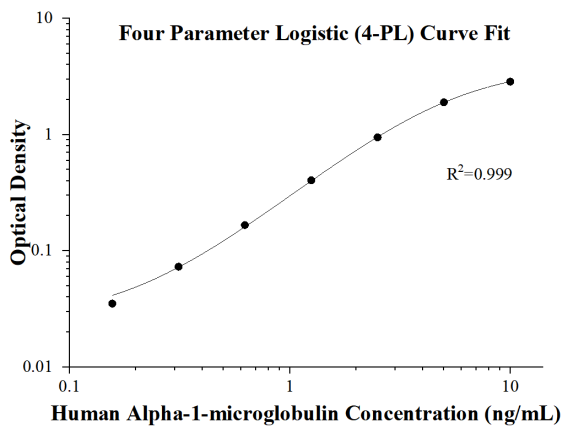
8.10 数据分析：每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD值为纵坐标，使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

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 μL	120 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
2	HRP标记检测抗体（1×）	100 μL	40 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
3	显色 TMB	100 μL	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37°C孵育，避光
4	终止液	100 μL	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	0.041 0.0395	0.04025	-
0.156	0.0752 0.0756	0.0754	0.03515
0.313	0.1136 0.1129	0.11325	0.073
0.625	0.2053 0.2084	0.20685	0.1666
1.25	0.4327 0.4574	0.44505	0.4048
2.5	0.9937 0.9795	0.9866	0.94635
5	1.9305 1.9451	1.9378	1.89755
10	2.9079 2.893	2.90045	2.8602

### 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)				
样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%
1	8	5.26	0.17	3.30
2	8	1.53	0.04	2.62
3	8	0.52	0.03	6.19

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	16	5.00	0.31	6.12
2	16	1.47	0.08	5.12
3	16	0.49	0.04	7.73

### 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Alpha-1-microglobulin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	1:6400	103	98-107
	1:12800	96	87-102
细胞上清	1:640	106	94-119
尿液	1:1600	95	92-97
	1:3200	100	86-109

## 9.4 样本值

人血浆/尿液 - 应用本试剂盒，检测人血浆和尿液样本中人Alpha-1-microglobulin的浓度。

样本类型	均值 (µg/mL)	范围 (µg/mL)
人血浆样本 (n=16)	17.20	9.30-25.98
尿液样本 (n=8)	1.18	0.14-2.29

细胞上清 - HepG2人肝细胞癌细胞在含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。收集细胞上清，并检测人Alpha-1-microglobulin的浓度为410.72 ng/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Alpha-1-microglobulin的灵敏度为0.04 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：

(人血浆样本预先稀释1600倍，细胞上清样本预先稀释40倍，尿液样本预先稀释200倍。)

		人血浆	细胞上清	尿液
1:2	均值 (%)	100	100	100
	范围 (%)	-	-	-
1:4	均值 (%)	94	95	91
	范围 (%)	93-95	93-96	90-92
1:8	均值 (%)	91	95	83
	范围 (%)	87-94	90-100	82-84
1:16	均值 (%)	87	88	85
	范围 (%)	85-89	82-94	83-86

## 9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人Alpha-1-microglobulin。

## 十：参考文献

1. Pervaiz, S, and K Brew. Science (New York, N.Y.) vol. 228,4697 (1985): 335-7.
2. Allhorn, Maria et al. Blood vol. 99,6 (2002): 1894-901.
3. Gunnarsson, Rolf et al. Drug discovery today vol. 22,4 (2017): 736-743.
4. Grubb, A O et al. The Journal of biological chemistry vol. 258,23 (1983): 14698-707.
5. Berggård, T et al. European journal of biochemistry vol. 245,3 (1997): 676-83.
6. Olsson, Magnus G et al. PloS one vol. 6,11 (2011): e27505.
7. May, K et al. Placenta vol. 32,4 (2011): 323-32.