

人FGFR4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: KE00321
规格: 96T
灵敏度: 5.7 pg/mL
检测范围: 31.25-2000 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FGFR4浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

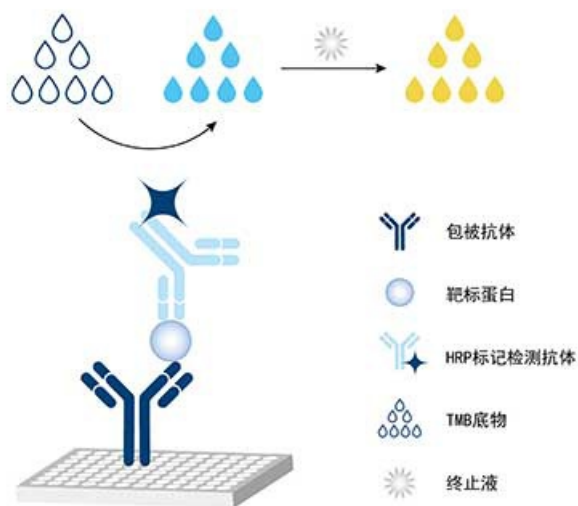
目录

| | |
|------------|---|
| 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

成纤维细胞生长因子受体 4 (FGFR4) 与 FGFR1-3 一样，都是高度保守的酪氨酸激酶家族的成员。该家族由细胞内酪氨酸激酶结构域、单个跨膜结构域和细胞外配体结合结构域组成。FGFR4 是人肝细胞中存在的主要 FGFR 亚型。FGFR4 被认为在观察到的 FGF19 诱导肝细胞增殖和癌变中发挥作用；然而，也有证据表明 FGFR4 在抑制肝癌进程方面起着保护作用。虽然 FGFR4 在癌症中的作用仍有待充分阐明，但多项研究结果表明，该受体可能在肝细胞癌 (HCC) 发生或进程中发挥重要作用。

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 * | 4000 pg/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 1 | 样本稀释液 PT 1 | 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 |
| 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。

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。

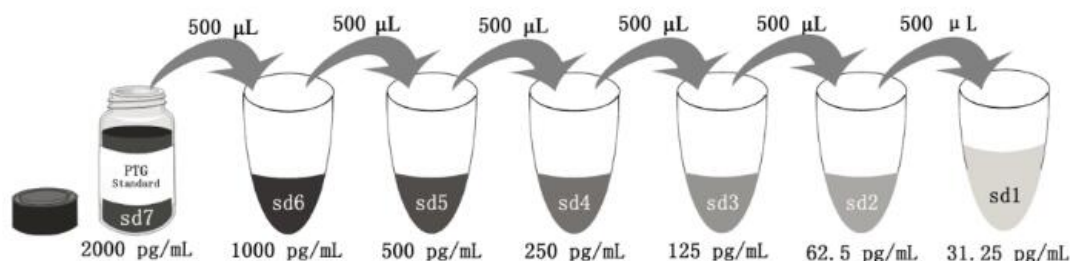
7.3 待检测样本：

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1:16或1:32稀释; 细胞上清样本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：

使用2 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 | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL |
| # μL of Sample Diluent PT 1 | 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20-30min（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；

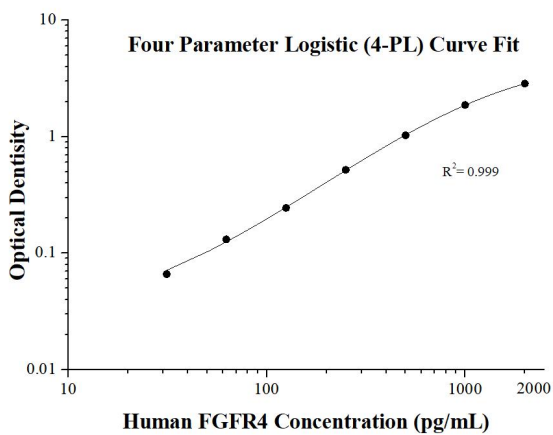
8.10 数据分析：每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD值为纵坐标，使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

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



| (pg/mL) | O.D | Average | Corrected |
|---------|------------------|---------|-----------|
| 0 | 0.0628 0.0628 | 0.0628 | - |
| 31.25 | 0.1307 0.1271 | 0.1289 | 0.0661 |
| 62.5 | 0.1874 0.2009 | 0.19415 | 0.13135 |
| 125 | 0.3141 0.3003 | 0.3072 | 0.2444 |
| 250 | 0.5864 0.577 | 0.5817 | 0.5189 |
| 500 | 1.0673 1.112 | 1.08965 | 1.02685 |
| 1000 | 1.9139 1.9497 | 1.9318 | 1.869 |
| 2000 | 2.8929 2.9401 | 2.9165 | 2.8537 |

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 | 1,123.7 | 45.5 | 4.0 |
| 2 | 20 | 285.5 | 10.1 | 3.5 |
| 3 | 20 | 71.0 | 3.6 | 5.1 |

| 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 | 1,158.0 | 45.1 | 3.9 |
| 2 | 24 | 285.3 | 11.2 | 3.9 |
| 3 | 24 | 72.5 | 5.7 | 7.8 |

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FGFR4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 | 1:32 | 111 | 103-117 |
| | 1:64 | 111 | 109-116 |
| 细胞上清 | 1:16 | 112 | 109-117 |
| | 1:32 | 104 | 87-112 |

9.4 样本值

人血浆 - 应用本试剂盒，检测16份人血浆样本中人FGFR4的浓度。

| 样本类型 | 均值 (pg/mL) | 范围 (pg/mL) |
|------------|------------|----------------|
| 人血浆 (n=16) | 6877.1 | 1343.1-12219.1 |

细胞上清 - HepG2人肝细胞癌细胞在含10%胎牛血清、2 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FGFR4的浓度为4681.8 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FGFR4的灵敏度为5.7 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：

(人血浆样本预先稀释8倍，细胞上清样本预先稀释2倍。)

| | | 人血浆 | 细胞上清 |
|------|--------|---------|-------|
| 1:2 | 均值 (%) | 100 | 100 |
| | 范围 (%) | - | - |
| 1:4 | 均值 (%) | 101 | 95 |
| | 范围 (%) | 97-103 | 92-97 |
| 1:8 | 均值 (%) | 107 | 95 |
| | 范围 (%) | 102-110 | 92-97 |
| 1:16 | 均值 (%) | 112 | 94 |
| | 范围 (%) | 97-120 | 90-97 |

十：参考文献

1. Levine KM. et al. (2020). Pharmacol Ther. 214: 107590.
2. Wu X. et al. (2009). J Biol Chem. 285(8):5165-5170.
3. Kan M. et al. (1999). J Biol Chem. 274(22):15947-15952.