

人FSTL1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: KE00744
规格: 96T
灵敏度: 0.18 ng/mL
检测范围: 0.625-40 ng/mL
用途: 此试剂盒用于定量检测细胞裂解液和组织裂解液中的人FSTL1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	5
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	8
9.7 特异性	9
十：参考文献	9

一：背景信息

卵泡listatin-like 1 (Fstl1) 是富含半胱氨酸的分泌蛋白 (SPARC) 家族的一员, 参与了许多不同的信号通路, 包括骨形态发生蛋白 (BMP) 信号传导。在许多不同的发育过程中, 如背腹轴的建立, 骨骼, 肺和输尿管的发育, 功能丧失实验揭示了Fstl1的重要作用。Fstl1主要通过抑制与BMP信号通路的相互作用发挥作用, 尽管在各种疾病模型中, 不同的信号通路, 如pAKT、pAMPK、Na/ k - atp酶的激活或先天免疫反应, 都与Fstl1有关。有人提出, Fstl1干扰BMP受体复合物的形成, 从而抑制BMP信号在细胞内的传播。

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 *	80 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 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
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°C)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°C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。

6.2 组织裂解液:

- 1) 使用预冷的1×PBS清洗组织,吸干水分后,用剪刀剪碎,加入适量的裂解液(加PMSF至裂解液中,终浓度为1 mM,每100 mg组织加入1 mL裂解液,不同样本需自行优化);
- 2) 转移到预冷玻璃匀浆器中,匀浆约20-30下。匀浆效果与细胞类型和组织类型相关,不同细胞或组织所需的匀浆次数有所不同,需自行优化;
- 3) 匀浆20-30次后取约2-3 μ L细胞或组织匀浆液滴在盖玻片上并在显微镜下观察,如见细胞核周晕环或完整的细胞形态,说明细胞仍完整。如果有70-80%的细胞均无核周晕环和完整细胞形态,说明细胞已经充分破碎,则进行下一步实验。否则,重新匀浆10-30次直到细胞至少90%已经破碎;
- 4) 细胞破碎后8000×g-10000×g离心5 min,分离上清,分装后-80°C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 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 μ L/孔),实际配制时应多配制0.1-0.2 mL。如10 μ L HRP标记检测抗体浓缩液 (100×) 加 990 μ L 抗体稀释液进行配制,轻轻混匀。

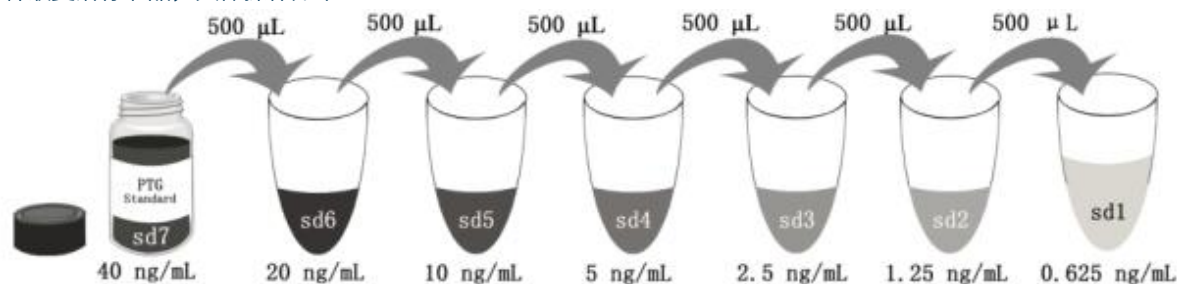
7.3 待检测样本:

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:细胞裂解液和组织裂解液样本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:

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 \times ）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 \times ）（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；

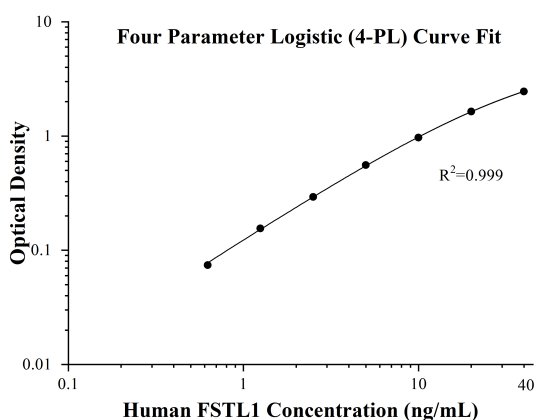
8.10 数据分析：每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD值为纵坐标，使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

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 μ L	120 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
2	HRP标记检测抗体 (1 \times)	100 μ L	40 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
3	显色 TMB	100 μ L	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37°C孵育，避光
4	终止液	100 μ L	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	0.021 0.0249	0.02295	-
0.625	0.0914 0.1015	0.09645	0.0735
1.25	0.1771 0.1781	0.1776	0.15465
2.5	0.3118 0.3192	0.3155	0.29255
5	0.5754 0.5836	0.5795	0.55655
10	0.9677 1.0133	0.9905	0.96755
20	1.6391 1.686	1.66255	1.6396
40	2.4718 2.493	2.4824	2.45945

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	14.50	0.76	5.24
2	8	4.25	0.24	5.68
3	8	2.48	0.24	9.73

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	15.35	1.46	9.49
2	16	4.15	0.27	6.57
3	16	2.38	0.21	8.90

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FSTL1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 (%)
裂解液	1:64	80	71-93

9.4 样本值

裂解液

	人 FSTL1 (ng/mL)	总蛋白 (mg/mL)
HeLa 细胞裂解液	136.48	1.30
A431 细胞裂解液	270.41	3.70
C6 细胞裂解液	156.38	2.00
人胎盘组织裂解液	15.68	2.40

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FSTL1的灵敏度为0.18 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：

(裂解液样本预先稀释4倍。)

		裂解液
1:2	均值 (%)	100
	范围 (%)	-
1:4	均值 (%)	103
	范围 (%)	102-105
1:8	均值 (%)	96
	范围 (%)	85-111
1:16	均值 (%)	98
	范围 (%)	87-120

9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人FSTL1，加入50 ng/mL以下细胞因子，无明显交叉反应。

Human:

Agrin

FSTL4

FSTL5

十：参考文献

1. Sylva, M et al. *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews* vol. 99,1 (2013): 61-9.
2. Zhou, Fengqi et al. *Cancer letters*, vol. 611 217400. (2024).