

人GPC1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: KE00364

规格: 96T

灵敏度: 0.03 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、细胞裂解液以及组织裂解液中的人GPC1浓度

本产品仅用于科学研究, 不适用于临床诊断

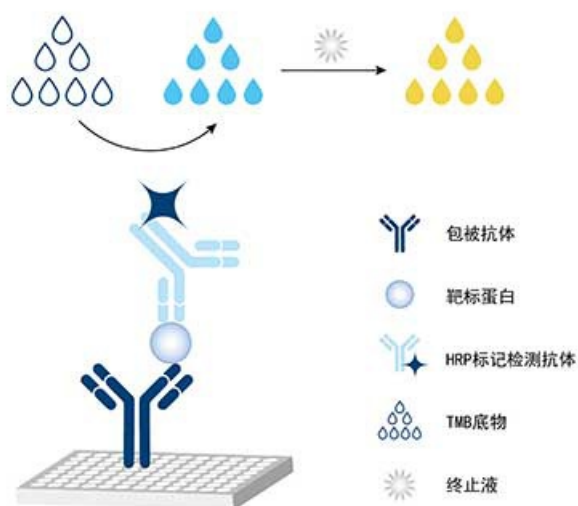
目录

- 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 8
 - 9.3 加标回收率 8
 - 9.4 样本值 9
 - 9.5 灵敏度 9
 - 9.6 线性 9
 - 9.7 特异性 10
- 十：参考文献 10

一：背景信息

磷脂酰肌醇蛋白聚糖是通过糖基磷脂酰肌醇锚附着于细胞膜的HSPGs家族。磷脂酰肌醇蛋白聚糖被认为具有调节HBGFs活性的能力。磷脂酰肌醇蛋白聚糖的表达在发育过程中受到时间和空间的调节，表明它们参与发育和形态发生。迄今为止，已在哺乳动物中鉴定出六种磷脂酰肌醇蛋白聚糖(GPC1至GPC6)。GPC1在成人组织中广泛表达。GPC1通过HBGFs促进有效的信号传导，并在细胞生长和分化中发挥关键作用。GPC1参与肿瘤发生和血管生成，并且在包括胰腺癌、乳腺癌和神经胶质瘤在内的几种类型的肿瘤中经常过表达。

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 uL/管	1 管
Sample Diluent PT 1	样本稀释液 PT 1 (用于细胞上清和尿液样本)	30 mL/瓶	1 瓶
Sample Diluent PT 4B1	样本稀释液 PT 4B1 (用于人血清、细胞裂解液和组织裂解液样本)	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
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 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 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℃存放，避免反复冻融。

6.5 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。

6.6 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 μL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℃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℃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 990 μL 抗体稀释液进行配制，轻轻混匀。

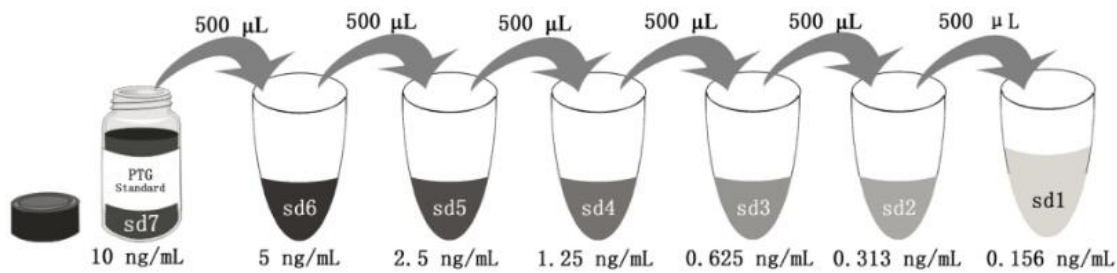
7.3 待检测样本：

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1:4或者1:8稀释；尿液样本1:2或1:4稀释；细胞裂解液样本1:2或1:4稀释；组织裂解液样本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。

7.4 梯度稀释的标准品：

检测细胞上清和尿液样本，用2 mL PT 1样本稀释液复溶标准品；检测人血清、血浆、细胞裂解液和组织裂解液，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 or 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

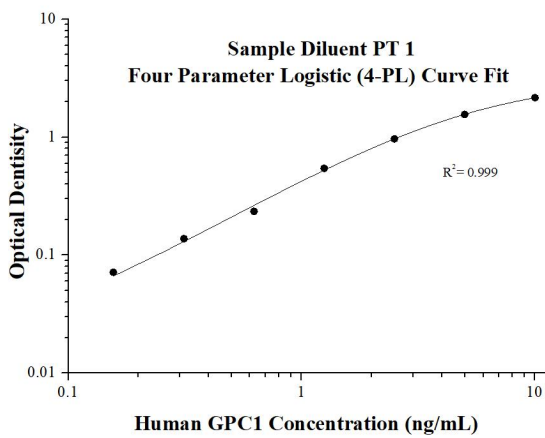
- 实验前，需要将所需试剂在室温平衡20-30min（HRP标记检测抗体浓缩液不需要平衡室温，即用即取）；在进行标准品、样本以及不同试剂加样时，更换枪头，避免接触微孔板的内表面，不同的试剂，使用不同的加样槽。
- 8.1 根据实验用量，取出需要用到的酶标板条，剩余板条加入干燥剂放入铝箔袋密封后存放于4℃，并于一周之内用完；
- 8.2 加样，分别设零孔、标准孔、待测样本孔。零孔加样本稀释液100 µL，余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本100 µL/孔，注意不要产生气泡（建议标准品和样本都做复孔，尽量避免实验误差，确保上样不间断，5-10 min完成加样）；
- 8.3 酶标板盖上覆膜，37℃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℃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℃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：

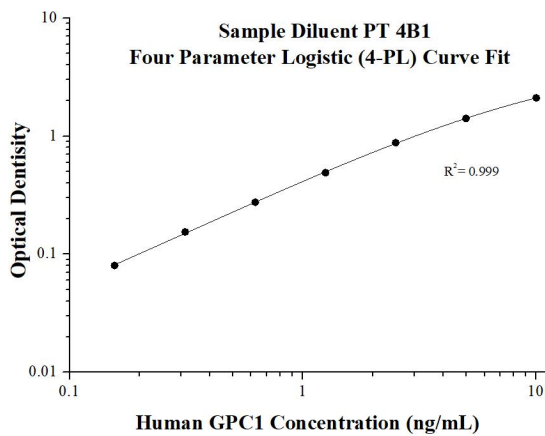
步骤	试剂	体积	孵育时间	洗涤次数	孵育温度
1	标准品或样本	100 μL	120 分钟	4 次	覆膜后37℃孵育
2	HRP标记检测抗体（1×）	100 μL	40 分钟	4 次	覆膜后37℃孵育
3	显色 TMB	100 μL	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37℃孵育，避光
4	终止液	100 μL	0 分钟	不需要洗涤	-
5	加入终止液后以630 nm为校正波长，在450 nm处测量OD值，此过程建议不超过5分钟				

九：实验参数

9.1 参考标曲图



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.0497 0.0462	0.04795	-
0.156	0.1227 0.1161	0.1194	0.07145
0.313	0.1865 0.1851	0.1858	0.13785
0.625	0.2526 0.3125	0.28255	0.2346
1.25	0.6238 0.5588	0.5913	0.54335
2.5	1.0718 0.9580	1.0149	0.96695
5	1.6936 1.5157	1.60465	1.5567
10	2.2135 2.2025	2.208	2.16005



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.0335 0.0279	0.0307	-
0.156	0.1096 0.1122	0.1109	0.0802
0.313	0.1860 0.1835	0.18475	0.15405
0.625	0.3054 0.3064	0.3059	0.2752
1.25	0.4997 0.5410	0.52035	0.48965
2.5	0.8915 0.9273	0.9094	0.8787
5	1.4643 1.4147	1.4395	1.4088
10	2.1342 2.1425	2.13835	2.10765

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)					板间精密度 (CV 间)				
样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%	样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%
1	20	4.39	0.18	4.01	1	24	4.70	0.34	7.15
2	20	1.02	0.04	3.55	2	24	1.08	0.08	7.47
3	20	0.25	0.01	5.77	3	24	0.27	0.02	7.15

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GPC1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 (%)
人血清	1:64	100	82-120
	1:128	93	81-103
细胞上清	1:16	91	86-94
	1:32	88	76-98
尿液	1:8	86	84-91
	1:16	79	70-89
细胞裂解液	1:8	84	78-90
	1:16	90	82-97
组织裂解液	1:16	90	82-97
	1:32	90	80-96

9.4 样本值

人血清/尿液 - 应用本试剂盒，检测人血清和尿液样本中人GPC1的浓度。

样本类型	均值 (ng/mL)	范围 (ng/mL)
人血清 (n=14)	27.95	10.31-102.79
尿液 (n=8)	4.47	0.87-8.13

细胞上清 - MCF-7细胞在含有10%胎牛血清、4 mM/L谷氨酰胺、4500 mg/L葡萄糖、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GPC1的浓度为13.93 ng/mL。

HepG2细胞在含有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中培养。收集细胞上清，并检测人GPC1的浓度为7.05 ng/mL。

细胞裂解液/组织液:

样本类型	人GPC1 (ng/mL)	总蛋白 (mg/mL)
MDA-MB-468 细胞裂解液	9.97	3.10
胎盘组织裂解液	19.04	1.80

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GPC1的灵敏度为0.03 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：

(人血清样本预先稀释8倍，细胞上清样本预先稀释2倍，组织裂解液样本预先稀释2倍。)

		人血清 (样本稀释液 PT 4B1)	细胞上清 (样本稀释液 PT 1)	尿液 (样本稀释液 PT 1)	细胞裂解液 (样本稀释液 PT 4B1)	组织裂解液 (样本稀释液 PT 4B1)
1:2	均值 (%)	100	100	100	100	100
	范围 (%)	-	-	-	-	-
1:4	均值 (%)	105	99	104	89	95
	范围 (%)	88-119	97-102	99-110	86-93	86-105
1:8	均值 (%)	98	103	118	83	98
	范围 (%)	82-114	98-106	116-121	80-86	98-99
1:16	均值 (%)	96	110	106	97	103
	范围 (%)	72-118	90-120	102-111	90-104	99-107

9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人GPC1，加入50 ng/mL以下类似物或干扰物，无明显交叉反应。

Human:

Endostatin

Glypican 2

Glypican 3

Glypican 4/Fc Chimera

Glypican 5

十：参考文献

1. Lund ME, et al. The Role of Glypican-1 in the Tumour Microenvironment. *Adv Exp Med Biol.* 1245:163-176(2020).
2. Pan J and Ho M. Role of glypican-1 in regulating multiple cellular signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol.* 321(5):C846-C858(2021).
3. Liu J, et al. The biology, function, and applications of exosomes in cancer. *Acta Pharm Sin B.* 11(9):2783-2797(2021).
4. Tarbell JM and Cancel LM. The glycocalyx and its significance in human medicine. *J Intern Med.* 280(1):97-113(2016).
5. Takahashi Y, et al. Application of Immunohistochemistry in the Pathological Diagnosis of Liver Tumors. *Int J Mol Sci.* 22(11):5780(2021).