

## Speedy™ 人GPC1一步法ELISA检测试剂盒

请在实验前仔细阅读本说明书

产品货号: SE50161

规格: 96T

灵敏度: 0.01 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、尿液以及组织裂解液中人GPC1浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

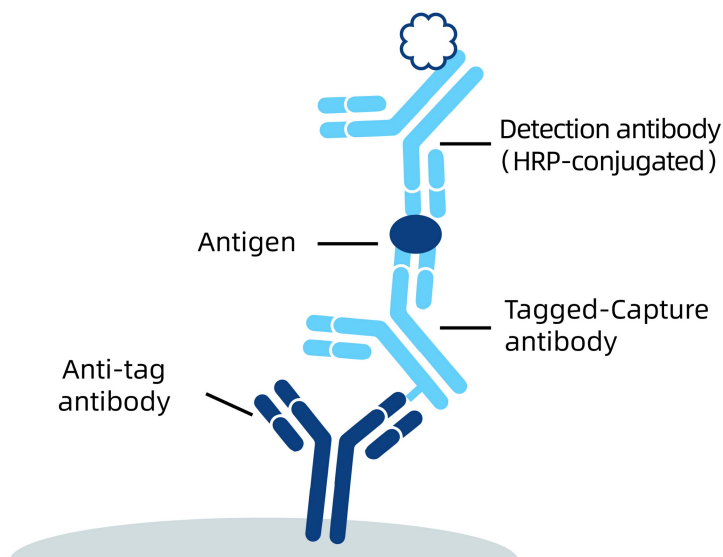
# 目录

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



抗标签抗体预先包被于板孔，可结合带标签的捕获抗体。抗原或样本、捕获抗体及辣根过氧化物酶（HRP）标记的检测抗体加入后，在溶液中形成夹心复合物。在HRP催化下，四甲基联苯胺（TMB）使底物溶液由无色变蓝，加入终止液后变黄。溶液颜色深浅与结合蛋白量成正比。测量波长为450 nm，校正波长为630 nm。

## 三：需自备的实验器材

- 3.1 酶标仪（可读取450nm和630nm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，也可使用Proteintech 公司数据分析网站：<https://www.ptgcn.com/products/elisa-kits/>；
- 3.8 微孔板恒温振荡器。

## 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
Capture antibody (100×)	捕获抗体浓缩液 (100×) **	60 μL/支	1 支
Detection antibody, HRP-conjugated (100×)	HRP 标记检测抗体浓缩液 (100×) **	60 μL/支	1 支
Sample Diluent PT 3	样本稀释液 PT 3	30 mL/瓶	1 瓶
Detection Diluent	抗体稀释液	15 mL/瓶	1 瓶
Wash Buffer Concentrate (20×)	浓缩洗涤液 (20×)	30 mL/瓶	1 瓶
Extraction Reagent	裂解液	15 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，详见7.4部分，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。

6.5 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°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×）的配制：

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1×洗涤液。

### 7.2 抗体混合液（1×）的配制：

开盖前瞬时离心，将捕获抗体和检测抗体稀释分别按1:100比例稀释到同一管稀释液中，配制检测所需的工作液。例如：将50 μL包被抗体浓缩液（100×）和50 μL检测抗体浓缩液（100×）加入4900 μL抗体稀释液，混匀配制成1×抗体混合液。

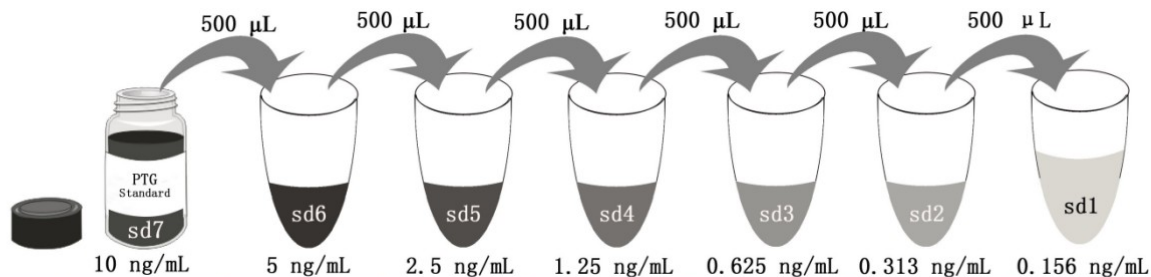
### 7.3 待检测样本：

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1:8到1:32稀释；细胞上清样本1:2或1:4稀释；尿液样本1:2到1:16稀释；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：

使用2 mL PT 3 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 3	<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20-30 min (捕获抗体浓缩液和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50 µL，余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本50 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 每孔加50 µL 抗体混合液(1×)(参照试剂准备部分7.2)，盖上封板膜，恒温振荡器上37°C 400 rpm 孵育 1 h(若无恒温振荡器，此步骤建议37°C静置孵育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；

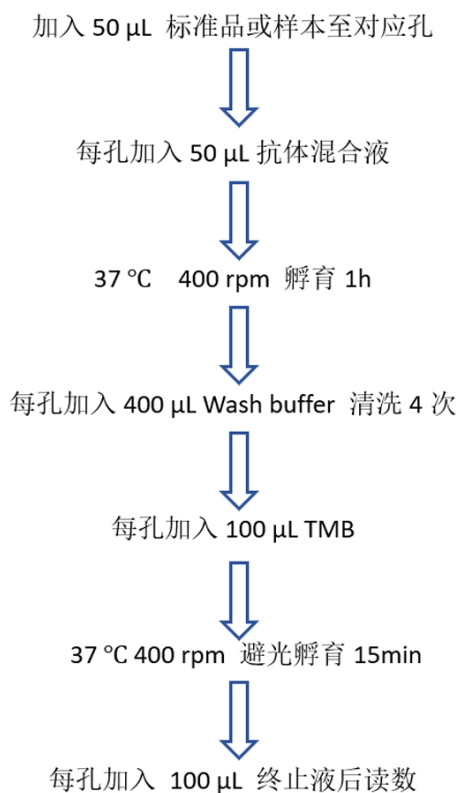
8.5 显色：每孔加TMB显色液100 µL，恒温振荡器上37°C 400 rpm 孵育15-20 min (如果颜色偏浅，可适当延长显色时间，不超过30 min；保持显色底物始终处于避光状态，显色底物在加样前应是无色透明，如有变色，请勿使用)；

8.6 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)

8.7 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；

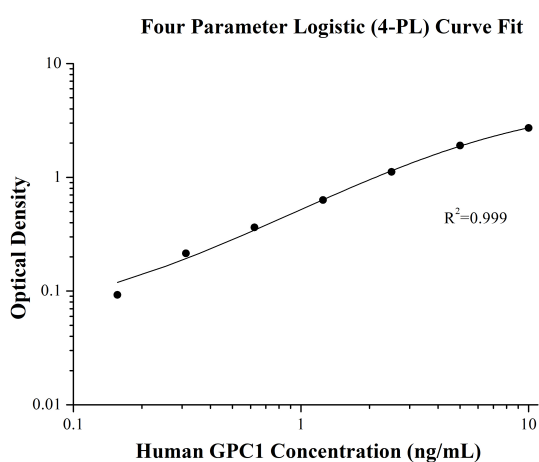
8.8 数据分析：每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD值为纵坐标，使用专业软件 (如Origin、ELISACalc等) 进行四参数拟合 (4-PL)，根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

操作流程如下：



## 九：实验参数

### 9.1 参考标曲图



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.0419 0.0422	0.04205	-
0.156	0.1287 0.1405	0.1346	0.09255
0.313	0.2527 0.2617	0.2572	0.21515
0.625	0.3787 0.4326	0.40565	0.3636
1.25	0.6724 0.6727	0.67255	0.6305
2.5	1.1471 1.174	1.16055	1.1185
5	1.9251 1.9597	1.9424	1.90035
10	2.7551 2.7694	2.76225	2.7202

## 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	5.48	0.07	1.28
2	8	1.32	0.09	6.82
3	8	0.61	0.02	3.28

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	5.71	0.45	7.88
2	16	1.30	0.07	5.38
3	16	0.64	0.04	6.25

## 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 (%)
人血浆	1:32	111	104-117
	1:64	108	107-109
细胞上清	1:2	99	97-103
	1:4	97	95-99
尿液	1:16	100	99-102
	1:32	101	98-105
组织裂解液	1:32	100	91-109
	1:64	99	90-107

## 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GPC1的浓度。

样本类型	均值 (ng/mL)	检出率 (%)	范围 (ng/mL)
人血浆 (n=16)	34.83	100	19.69-106.25
尿液 (n=8)	10.86	88	ND-42.90

ND\*=Non-detectable

### 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16.10 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1.70 ng/mL。

### 组织裂解液:

样本类型	人GPC1 (ng/mL)	总蛋白 (mg/mL)
人胎盘组织裂解液	30.90	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0.01 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8倍，尿液和组织裂解液样本预先稀释4倍。)

		人血浆	细胞上清	尿液	组织裂解液
1:2	均值 (%)	100	100	100	100
	范围 (%)	-	-	-	-
1:4	均值 (%)	95	89	95	104
	范围 (%)	90-100	84-93	93-97	103-105
1:8	均值 (%)	90	88	94	103
	范围 (%)	87-93	79-96	94-95	101-104
1:16	均值 (%)	89	78	93	103
	范围 (%)	88-91	73-84	92-94	100-105

## 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以下细胞因子，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, Maria E et al. *Advances in experimental medicine and biology* vol. 1245 (2020): 163-176.
2. Pan, Jiajia, and Mitchell Ho. *Cell physiology* vol. 321,5 (2021): C846-C858.
3. Liu, Jinyi et al. *Acta pharmaceutica Sinica. B* vol. 11,9 (2021): 2783-2797.
4. Tarbell, J M, and L M Cancel. *Journal of internal medicine* vol. 280,1 (2016): 97-113.
5. Takahashi, Yoshihisa et al. *International journal of molecular sciences* vol. 22,11 5780. 28 May. 2021.