

## Speedy™ 人IGF1R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: SE50176  
规格: 96T  
灵敏度: 0.05 ng/mL  
检测范围: 0.156-10 ng/mL, 0.313-20 ng/mL  
用途: 此试剂盒用于定量检测血清、血浆以及细胞裂解液中人IGF1R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	8
9.1 参考标曲图	8
9.2 精密度	8
9.3 加标回收率	9
9.4 样本值	9
9.5 灵敏度	9
9.6 线性	10
9.7 特异性	10
十：参考文献	10

## 一：背景信息

IGF1R（胰岛素样生长因子1受体）是一种跨膜受体酪氨酸激酶，在生长、发育、代谢及疾病发生中起关键作用。IGF1R是一个异四聚体，由两个胞外 $\alpha$ 亚基（配体结合结构域）和两个跨膜 $\beta$ 亚基（酪氨酸激酶结构域）组成。IGF1R可调控脂肪细胞发育与脂质储存，脂肪细胞特异性敲除该受体会导致循环IGF-1水平升高。

## 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 (用于人血清和血浆样本)	30 mL/瓶	1 瓶
Sample Diluent PT 5-ef	样本稀释液 PT 5-ef (用于细胞裂解液样本)	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°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, 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 $1 \times 10^7$ 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。

## 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。

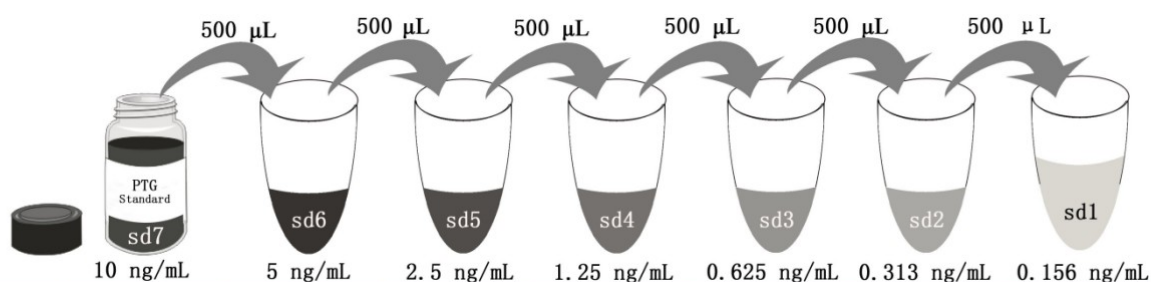
### 7.3 待检测样本:

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、血浆以及细胞裂解液样本1:2或1:4稀释; 样品采集、处理和储存的差异可能导致测值的改变。

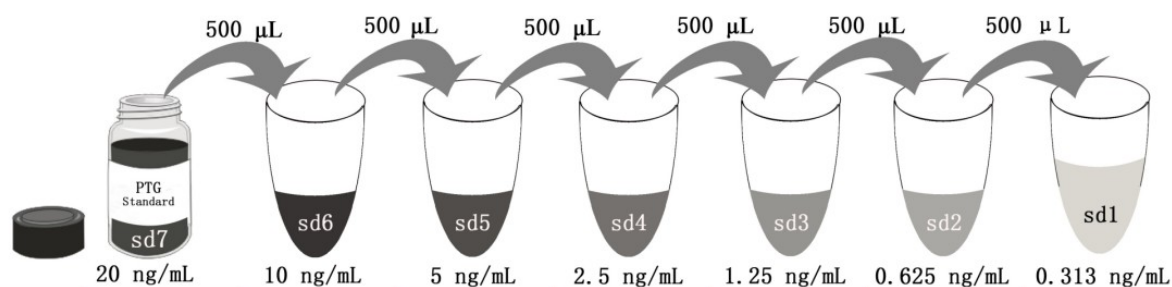
### 7.4 梯度稀释的标准品:

检测人血清和血浆样本, 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"

检测细胞裂解液样本, 使用1 mL PT 5-ef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 5-ef	<b>1000 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  $\mu$ L,余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本50  $\mu$ L/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  $\mu$ L 抗体混合液(1 $\times$ )(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 $\times$ )洗涤板条,每孔350-400  $\mu$ L,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;

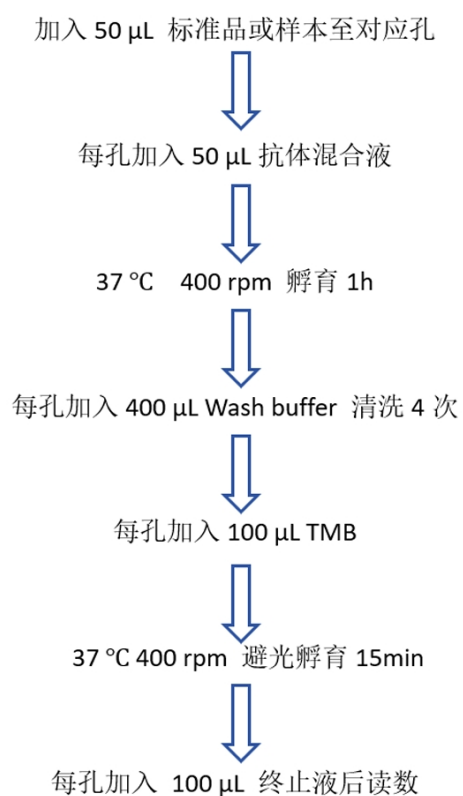
8.5 显色:每孔加TMB显色液100  $\mu$ L,恒温振荡器上37°C 400 rpm 孵育15-20 min(如果颜色偏浅,可适当延长显色时间,不超过30 min;保持显色底物始终处于避光状态,显色底物在加样前应是无色透明,如有变色,请勿使用);

8.6 终止:每孔加终止液100  $\mu$ L,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;

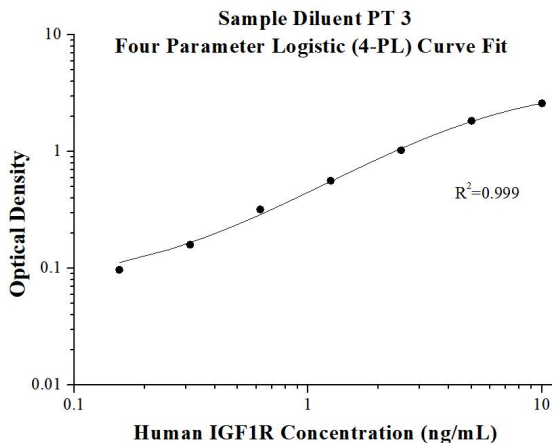
8.8 数据分析:每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值,设置复孔,取其平均值。以标准品的浓度为横坐标,OD值为纵坐标,使用专业软件(如Origin、ELISACalc等)进行四参数拟合(4-PL),根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度,乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

操作流程如下：

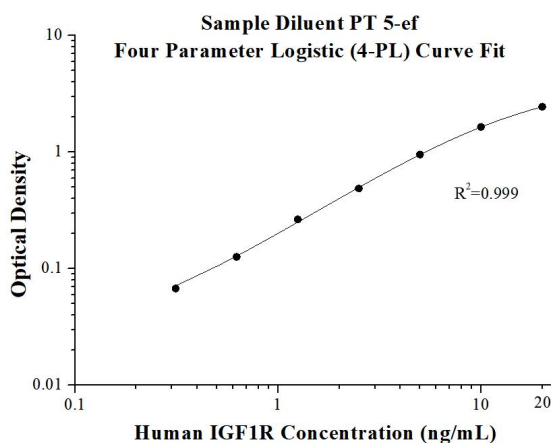


## 九：实验参数

### 9.1 参考标曲图



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.084 0.0598	0.0719	-
0.156	0.1683 0.1698	0.16905	0.09715
0.313	0.2181 0.245	0.23155	0.15965
0.625	0.3812 0.4033	0.39225	0.32035
1.25	0.6645 0.6087	0.6366	0.5647
2.5	1.0126 1.1874	1.1	1.0281
5	1.892 1.9304	1.9112	1.8393
10	2.6431 2.6958	2.66945	2.59755



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.026 0.0259	0.02595	-
0.313	0.0918 0.0952	0.0935	0.06755
0.625	0.1497 0.1543	0.152	0.12605
1.25	0.2641 0.3183	0.2912	0.26525
2.5	0.4613 0.5665	0.5139	0.48795
5	0.9639 0.9924	0.97815	0.9522
10	1.6408 1.6992	1.67	1.64405
20	2.4586 2.4977	2.47815	2.4522

### 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	4.26	0.08	1.88
2	8	1.17	0.02	1.71
3	8	0.63	0.02	3.17

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	4.20	0.10	2.38
2	16	1.17	0.03	2.56
3	16	0.65	0.04	6.15

### 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IGF1R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	1:8	81	80-82
	1:16	90	86-95
细胞裂解液	1:4	86	85-88
	1:8	89	89-91

### 9.4 样本值

人血浆 - 应用本试剂盒，检测人血浆样本中人IGF1R的浓度。

样本类型	均值 (ng/mL)	范围 (ng/mL)
人血浆样本 (n=16)	2.61	0.57-5.43

#### 细胞裂解液

	人IGF1R (ng/mL)	总蛋白量 (mg/mL)
MCF-7细胞裂解液	7.29	1.20
A549细胞裂解液	8.09	1.20
HeLa细胞裂解液	4.12	1.20
A431细胞裂解液	3.48	1.20

### 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IGF1R的灵敏度为0.05 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 (样本稀释液 PT 3)	细胞裂解液 (样本稀释液 PT 5-ef)
1:2	均值 (%)	100	100
	范围 (%)	-	-
1:4	均值 (%)	113	99
	范围 (%)	105-121	98-101
1:8	均值 (%)	113	99
	范围 (%)	106-120	98-99
1:16	均值 (%)	105	83
	范围 (%)	97-113	78-87

## 9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人IGF1R。

## 十：参考文献

1. Werner, Haim. International journal of molecular sciences vol. 24,19 (2023) 14882.
2. Kineman, Rhonda D et al. Journal of molecular endocrinology vol. 61,1 (2018): T187-T198.