proteintech
Antibodies | ELISA kits | Proteins

人IGFBP1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： KE00593

规 格： 96T

灵敏度： 11.4 pg/mL

检测范围: 62.5-4000 pg/mL

用 途： 此试剂盒用于定量检测血清、血浆、细胞上清、母乳以及细胞裂解液中的人IGFBP1浓度

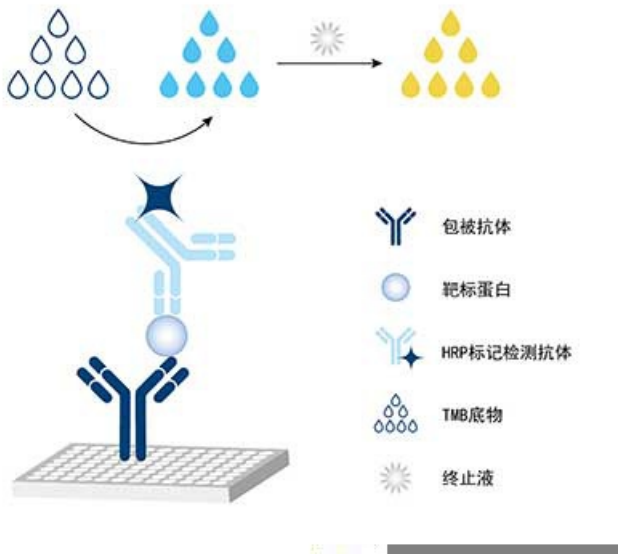
本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

一：背景信息

IGFBP1（胰岛素样生长因子结合蛋白-1）是 IGFBP 家族的成员之一，在调节胰岛素样生长因子 (IGFs) 的生物学功能中发挥关键作用。其N端和C端结构域含有保守的二硫键连接半胱氨酸，决定了其对IGF的高亲和力结合。IGFBP1主要由肝脏合成，参与哺乳动物的代谢调节。研究表明，IGFBP1与多种病理生理过程相关，其表达异常可能影响代谢性疾病、心血管疾病以及某些癌症的发生发展。

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。

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

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 *	8000 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 4B1	样本稀释液 PT 4B1	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°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。

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

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 母乳: 收集样本后，在2-8°C条件下1000×g离心15 min，取澄清部分，重复此过程2次，立即使用或分装后-20°C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°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。

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1:8或1:16稀释；细胞上清样本1:40或1:80稀释；母乳样本1:2到1:8稀释；细胞裂解液样本1:40或1:80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：

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

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	0.0753 0.0749	0.0751	-
62.5	0.1155 0.1217	0.1186	0.0435
125	0.1689 0.1622	0.16555	0.09045
250	0.2685 0.2725	0.2705	0.1954
500	0.4336 0.4634	0.4485	0.3734
1000	0.82 0.8736	0.8468	0.7717
2000	1.4561 1.5258	1.49095	1.41585
4000	2.4118 2.4631	2.43745	2.36235

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 (pg/mL)	标准差	变异系数CV%
1	8	2,033.2	164.6	8.1
2	8	516.6	43.6	8.4
3	8	268.8	23.1	8.6

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	16	2,014.6	168.6	8.4
2	16	511.8	36.1	7.1
3	16	278.9	25.9	9.3

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

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IGFBP1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	1:16	91	83-98
	1:32	86	73-103
细胞上清	1:150	105	100-111
母乳	1:8	79	71-87
	1:16	92	88-95
细胞裂解液	1:150	112	98-121
	1:300	104	96-114

9.4 样本值

人血清/母乳 - 应用本试剂盒，检测人血清和母乳样本中人IGFBP1的浓度。

样本类型	均值 (ng/mL)	范围 (ng/mL)
人血清样本 (n=16)	14.9	1.9-46.9

样本类型	均值 (pg/mL)	范围 (pg/mL)
母乳样本 (n=8)	1155.3	278.2-6708.7

细胞上清 - 人肝癌细胞HepG2 (1 x 10^6 cells/mL)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培养基中培养。收集细胞上清，检测人IGFBP1的浓度为40.9 ng/mL。

细胞裂解液

	人IGFBP1 (ng/mL)	总蛋白量 (mg/mL)
HepG2细胞裂解液	40.7	1.8

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IGFBP1的灵敏度为11.4 pg/mL。

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

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4倍，细胞上清样本预先稀释10倍，母乳样本预先稀释4倍，细胞裂解液样本预先稀释20倍。）

		人血清	细胞上清	母乳	细胞裂解液
1:2	均值（%）	100	100	100	100
	范围（%）	-	-	-	-
1:4	均值（%）	104	98	95	104
	范围（%）	97-111	83-113	89-100	102-106
1:8	均值（%）	99	84	89	114
	范围（%）	98-100	82-85	89-90	104-125
1:16	均值（%）	87	97	93	113
	范围（%）	82-93	90-104	86-101	101-124

9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人IGFBP1，加入50 ng/mL以下细胞因子，无明显交叉反应。

Human:

IGFBP3

IGFBP5

IGFBP6

十：参考文献

1. Lewitt, Moira S, and Gary W Boyd. Biomolecules vol. 14,11 (2024): 1475.
2. Bae, Jae-Hoon et al. Journal of lifestyle medicine vol. 3,2 (2013): 73-79.
3. Ezzat, Vivienne A et al. Diabetes, obesity & metabolism vol. 10,3 (2008): 198-211.

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com