

人/小鼠/大鼠TH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: KE00991
规格: 96T
灵敏度: 10.8 pg/mL
检测范围: 39-2500 pg/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/小鼠/大鼠TH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 | 8 |
| 十：参考文献 | 9 |

一：背景信息

人酪氨酸羟化酶（TH）由位于染色体11p15.5上的单拷贝 TH 基因编码，该基因包含13个外显子。酪氨酸羟化酶主要分布于中枢神经系统和肾上腺髓质，其活性受到多层次的精密调控，包括通过前体mRNA的选择性剪接调节基因表达、mRNA的转录后修饰以及TH蛋白的磷酸化等。传统上，TH的研究集中于神经精神疾病领域，因为多巴胺和去甲肾上腺素这两种重要神经递质均需依赖TH在脑细胞中合成。多项研究表明，TH 基因突变是多种神经系统疾病的重要致病因素，例如双相情感障碍、精神分裂症和帕金森病。

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 * | 5000 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 3 | 样本稀释液 PT 3 | 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。

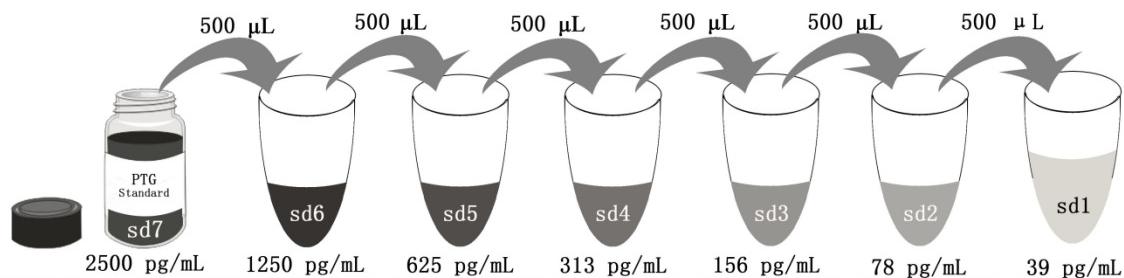
7.3 待检测样本:

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:裂解液样本1:200或1:400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 | 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；

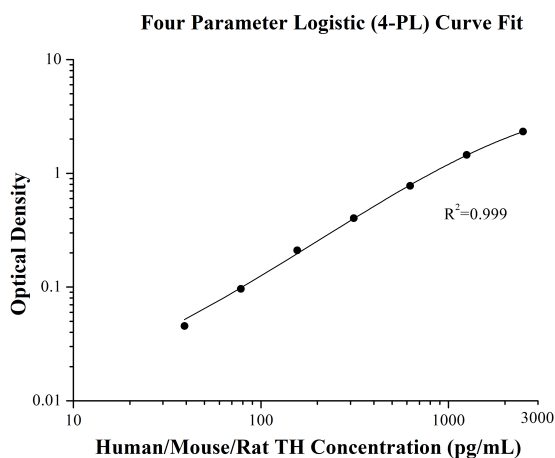
8.10 数据分析：每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD值为纵坐标，使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

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



| (pg/mL) | O.D | Average | Corrected |
|---------|------------------|---------|-----------|
| 0 | 0.0384 0.0343 | 0.03635 | - |
| 39 | 0.0805 0.0832 | 0.08185 | 0.0455 |
| 78 | 0.1331 0.1322 | 0.13265 | 0.0963 |
| 156 | 0.2457 0.2474 | 0.24655 | 0.2102 |
| 313 | 0.4447 0.4332 | 0.43895 | 0.4026 |
| 625 | 0.8123 0.8131 | 0.8127 | 0.77635 |
| 1250 | 1.5287 1.4443 | 1.4865 | 1.45015 |
| 2500 | 2.3829 2.3423 | 2.3626 | 2.32625 |

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 | 1,225.6 | 58.9 | 4.8 |
| 2 | 8 | 312.3 | 20.1 | 6.4 |
| 3 | 8 | 172.7 | 5.1 | 3.0 |

| 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 | 1,243.1 | 74.2 | 6.0 |
| 2 | 16 | 305.7 | 17.1 | 5.6 |
| 3 | 16 | 171.9 | 9.2 | 5.4 |

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/小鼠/大鼠TH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 | 1:1600 | 95 | 84-102 |
| | 1:3200 | 98 | 93-103 |

9.4 样本值

细胞/组织裂解液

| | 人/小鼠/大鼠TH (ng/mL) | 总蛋白量 (mg/mL) |
|------------|-------------------|--------------|
| MCF-7细胞裂解液 | 5.2 | 1.3 |
| SW480细胞裂解液 | 5.3 | 3.0 |
| PC-12细胞裂解液 | 376.8 | 3.1 |
| 小鼠脑组织裂解液 | 168.1 | 7.0 |
| 大鼠脑组织裂解液 | 222.6 | 8.2 |

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/小鼠/大鼠TH的灵敏度为10.8 pg/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100倍。)

| | | 裂解液 |
|------|--------|---------|
| 1:2 | 均值 (%) | 100 |
| | 范围 (%) | - |
| 1:4 | 均值 (%) | 105 |
| | 范围 (%) | 104-107 |
| 1:8 | 均值 (%) | 101 |
| | 范围 (%) | 100-103 |
| 1:16 | 均值 (%) | 102 |
| | 范围 (%) | 96-107 |

9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人/小鼠/大鼠TH。

十：参考文献

1. Grima, B et al. Nature vol. 326,6114 (1987): 707-11.
2. Nagatsu, T. Essays in biochemistry vol. 30 (1995): 15-35.
3. Tank, A William et al. Annals of the New York Academy of Sciences vol. 1148 (2008): 238-48.
4. Kunugi, H et al. American journal of medical genetics vol. 81,2 (1998): 131-3.
5. Souery, D et al. American journal of medical genetics vol. 88,5 (1999): 527-32.