版本号： Datasheet-KE00572-A.0

生效日期： 2025-03-24

# 人NRG1, isoform Alpha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： KE00572

规 格： 96T

灵敏度： 0.05 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、血浆以及细胞裂解液中的人NRG1, isoform Alpha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

# 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 ..... 7
9.1 参考标曲图 ..... 7
9.2 精密度 ..... 7
9.3 加标回收率 ..... 7
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

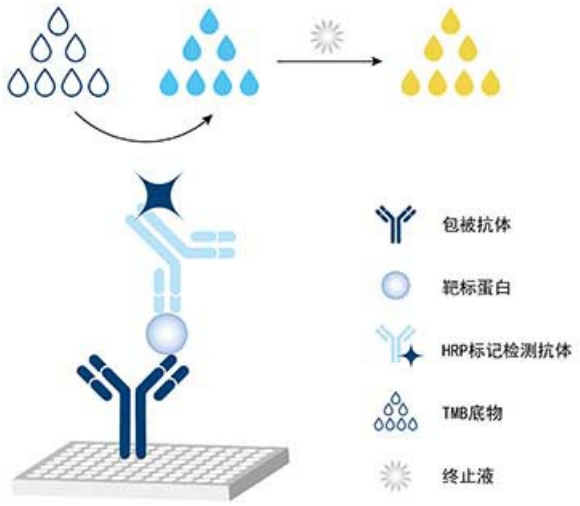


USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

## 一：背景信息

NRG1（神经调节蛋白-1）属于神经调节蛋白家族，该家族的生长因子负责心脏发育以及保护心脏免受应激损伤。NRG1是一种在心脏、乳腺和中枢神经系统的细胞信号传导中起核心作用的蛋白质。NRG1与神经发育、神经传递和突触可塑性密切相关。NRG1及其受体ErbB酪氨酸激酶不仅在发育中的神经系统中表达，也在成年大脑中表达。NRG1通过使用不同的启动子和单个基因的选择性剪接产生多种异构体。

## 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 * | 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 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°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。

## 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×$10^7$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。



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

## 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 uL/孔）, 实际配制时应多配制0.1-0.2 mL。如10 uL HRP标记检测抗体浓缩液（100×）加 990 uL **抗体稀释液**进行配制，轻轻混匀。

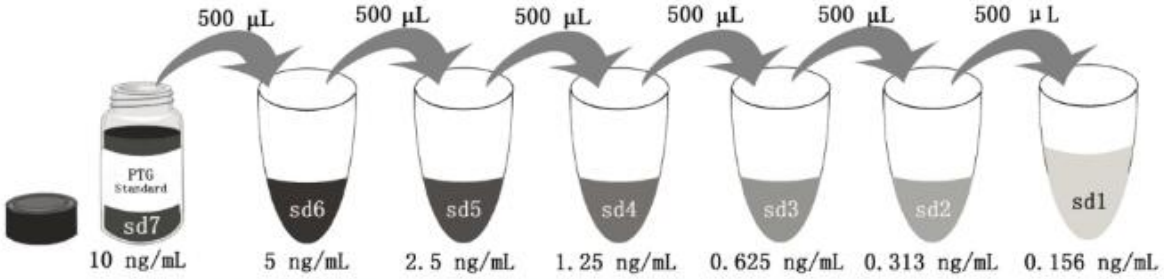
### 7.3 待检测样本：

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1:2稀释；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：

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" |



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

## 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×）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°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：

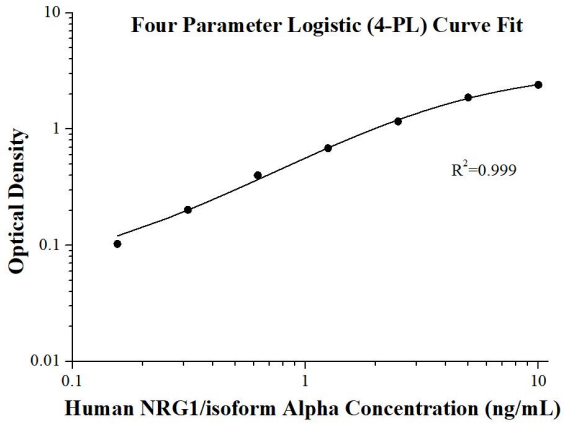
| 步骤 | 试剂 | 体积 | 孵育时间 | 洗涤次数 | 孵育温度 |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 标准品或样本 | 100 μL | 120 分钟 | 4 次 | 覆膜后37°C孵育 |
| 2 | HRP标记检测抗体（1×） | 100 μL | 40 分钟 | 4 次 | 覆膜后37°C孵育 |
| 3 | 显色 TMB | 100 μL | 15-20 分钟 | 不需要洗涤 | 覆膜后37°C孵育，避光 |
| 4 | 终止液 | 100 μL | 0 分钟 | 不需要洗涤 | - |
| 5 | 加入终止液后以630 nm为校正波长，在450 nm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



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

## 九：实验参数

### 9.1 参考标曲图




| (ng/mL) | O.D | Average | Corrected |
|---|---|---|---|
| 0 | 0.0587<br>0.0554 | 0.05705 | - |
| 0.156 | 0.1669<br>0.1529 | 0.1599 | 0.10285 |
| 0.313 | 0.2611<br>0.257 | 0.25905 | 0.202 |
| 0.625 | 0.4605<br>0.4541 | 0.4573 | 0.40025 |
| 1.25 | 0.7439<br>0.7385 | 0.7412 | 0.68415 |
| 2.5 | 1.2244<br>1.2171 | 1.22075 | 1.1637 |
| 5 | 1.9459<br>1.9108 | 1.92835 | 1.8713 |
| 10 | 2.4387<br>2.4816 | 2.46015 | 2.4031 |

### 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 | 4.15 | 0.18 | 4.31 |
| 2 | 8 | 1.97 | 0.05 | 2.30 |
| 3 | 8 | 1.95 | 0.03 | 1.73 |

| 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 | 5.18 | 0.37 | 7.13 |
| 2 | 16 | 1.23 | 0.06 | 4.64 |
| 3 | 16 | 0.64 | 0.03 | 4.62 |

### 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NRG1, isoform Alpha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 | 1:2 | 81 | 79-84 |
| 细胞裂解液 | 1:4 | 113 | 105-121 |
| | 1:8 | 106 | 98-114 |



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

## 9.4 样本值

人**血清** - 应用本试剂盒，检测人血清样本中人NRG1, isoform Alpha的浓度。

| 样本类型 | 平均值 (ng/mL) | 范围 (ng/mL) |
|---|---|---|
| 人血清 (n=16) | 0.36 | ND-0.97 |

**细胞裂解液**

| | 人 NRG1, isoform Alpha (ng/mL) | 总蛋白 (mg/mL) |
|---|---|---|
| HeLa 细胞裂解液 | 9.71 | 2.10 |
| A549 细胞裂解液 | 2.58 | 3.10 |

## 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NRG1, isoform Alpha的灵敏度为0.05 ng/mL。

## 9.6 线性

人血清加入高浓度的人NRG1, isoform Alpha蛋白，梯度稀释后检测样本加标线性。细胞裂解液样本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 | 细胞裂解液 |
|---|---|---|---|
| 1:2 | 均值 (%) | 100 | 100 |
| | 范围 (%) | 96-103 | - |
| 1:4 | 均值 (%) | 100 | 82 |
| | 范围 (%) | 99-101 | 76-90 |
| 1:8 | 均值 (%) | 118 | 90 |
| | 范围 (%) | 116-120 | 73-101 |
| 1:16 | 均值 (%) | 123 | 100 |
| | 范围 (%) | 121-124 | 74-119 |

## 9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人NRG1, isoform Alpha。



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

## 十：参考文献

1. Wang, Yan et al. Frontiers in pharmacology. 13 (2022): 945206.

2. Lin, Yuhao et al. International journal of molecular medicine. 46,3 (2020): 925-935.

3. Chen, Yong-Jun et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 107,50 (2010): 21818-23.

4. Vega-Torres, Julio David et al. Translational psychiatry. 12,1 (2022): 83.

5. Vullhorst, Detlef et al. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience. 37,21 (2017): 5232-5249.



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