

人、小鼠、大鼠PIP5K1A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: KE00227

规格: 96T

灵敏度: 0.008 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人、小鼠、大鼠PIP5K1A浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

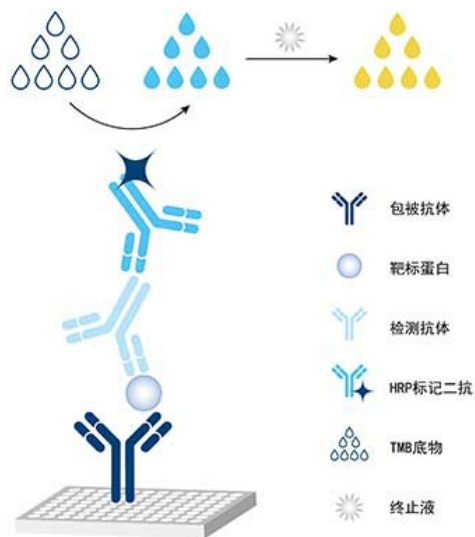
目录

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	8
9.1 参考标曲图	8
9.2 精密度	9
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

磷脂酰肌醇4-磷酸5-激酶（PIP5Ks）在许多生物的细胞生物学中发挥着多种作用，包括信号转导、分泌和囊泡运输以及调节细胞骨架组装。

二：检测原理



◀双抗夹心模式图 (检测抗体不标记)

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 *	20 ng/瓶	2 瓶
Detection antibody (100×)	检测抗体浓缩液 (100×) **	120 μL/支	1 支
HRP-conjugated antibody (100×)	HRP标记二抗浓缩液 (100×) **	120 μL/支	1 支
Sample Diluent PT 4-af	样本稀释液 PT 4-af (用于人血清、血浆样本)	30 mL/瓶	1 瓶
Sample Diluent PT 1-ef	样本稀释液 PT 1-ef (用于小鼠血清样本)	30 mL/瓶	1 瓶
Sample Diluent PT 3-ec	样本稀释液 PT 3-ec (用于大鼠血清和细胞裂解液样本)	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 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。

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 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 检测抗体浓缩液 (100×) 加 990 μL 抗体稀释液进行配制，轻轻混匀。

7.3 HRP 标记二抗 (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标记二抗浓缩液 (100×) 加 990 μL 抗体稀释液进行配制，轻轻混匀。

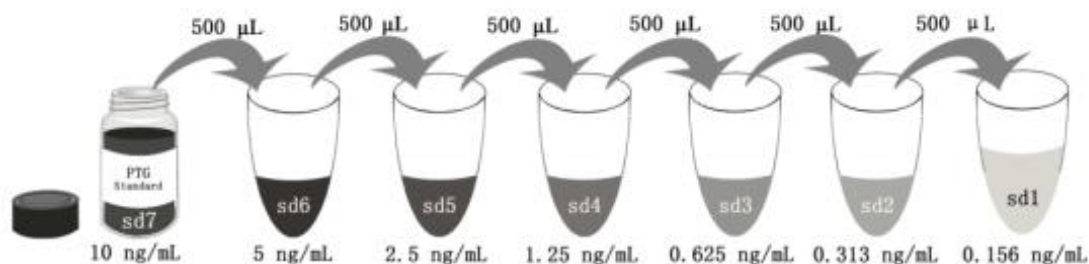
7.4 待检测样本：

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、血浆以及大鼠血清样本1:2稀释；小鼠血清样本1:25稀释；细胞裂解液样本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。

7.5 梯度稀释的标准品：

检测人血清、血浆样本，使用2 mL PT 4-af 样本稀释液复溶标准品。检测小鼠血清样本，使用2 mL PT 1-ef 样本稀释液复溶标准品。检测大鼠血清以及细胞裂解液样本，使用2 mL PT 3-ec 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 4-af, PT1-ef or PT 3-ec	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20-30 min (检测抗体浓缩液、HRP标记二抗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 检测抗体（1×）（参照试剂准备部分7.2），盖上封板膜，37°C孵育1 h；

8.6 重复步骤8.4；

8.7 每孔加 100 µL HRP标记二抗（1×）（参照试剂准备部分7.3），盖上封板膜，37°C孵育40 min；

8.8 重复步骤8.4；

8.9 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）；

8.10 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）

8.11 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；

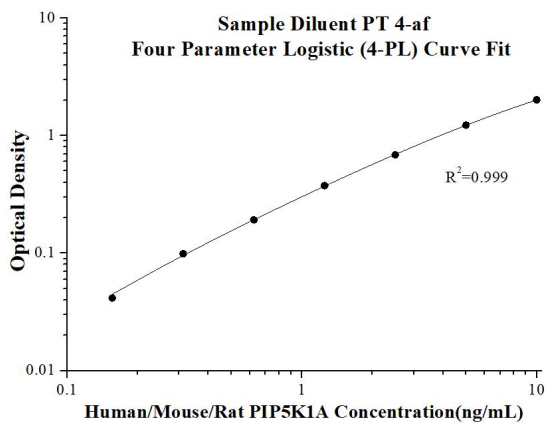
8.12 数据分析：每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

操作流程如下：

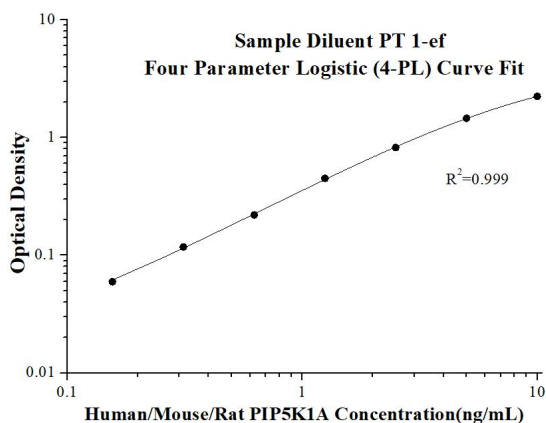
步骤	试剂	体积	孵育时间	洗涤次数	孵育温度
1	标准品或样本	100 μ L	120 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
2	检测抗体 (1 \times)	100 μ L	60 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
3	HRP标记二抗 (1 \times)	100 μ L	40 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
4	显色 TMB	100 μ L	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37°C孵育，避光
5	终止液	100 μ L	0 分钟	不需要洗涤	-
6	加入终止液后以630 nm为校正波长，在450 nm处测量OD值，此过程建议不超过5分钟				

九：实验参数

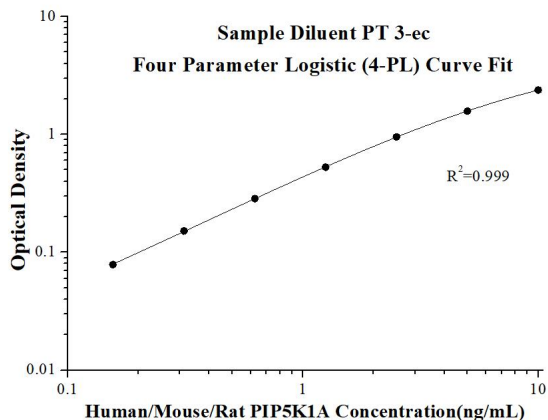
9.1 参考标曲图



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.078 0.083	0.0805	-
0.156	0.122 0.122	0.122	0.0415
0.313	0.177 0.182	0.1795	0.099
0.625	0.27 0.275	0.2725	0.192
1.25	0.453 0.459	0.456	0.3755
2.5	0.76 0.772	0.766	0.6855
5	1.294 1.321	1.3075	1.227
10	2.126 2.057	2.0915	2.011



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.064 0.064	0.064	-
0.156	0.125 0.122	0.1235	0.0595
0.313	0.183 0.18	0.1815	0.1175
0.625	0.284 0.284	0.284	0.22
1.25	0.51 0.517	0.5135	0.4495
2.5	0.893 0.879	0.886	0.822
5	1.522 1.516	1.519	1.455
10	2.303 2.292	2.2975	2.2335



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.083 0.08	0.0815	-
0.156	0.162 0.158	0.16	0.0785
0.313	0.239 0.227	0.233	0.1515
0.625	0.37 0.363	0.3665	0.285
1.25	0.609 0.609	0.609	0.5275
2.5	1.057 1.009	1.033	0.9515
5	1.654 1.664	1.659	1.5755
10	2.47 2.444	2.457	2.3755

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 20次；

板间精密度：3个不同浓度的样本在板间重复测定 24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	20	0.30	0.02	8.4
2	20	1.17	0.03	2.6
3	20	4.92	0.14	2.9

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	24	0.28	0.02	6.5
2	24	1.20	0.08	7.0
3	24	5.57	0.38	6.8

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PIP5K1A的加标回收率实验，结果如下：

样本类型	稀释倍数	范围 (%)	均值 (%)
人血浆	1:2	81-91	85
	1:4	80-98	88
小鼠血清	1:50	76-112	98
	1:100	79-120	106
大鼠血清	1:2	78-87	82
	1:4	81-97	89
细胞裂解液	1:60	75-95	83
	1:120	83-99	88

9.4 样本值

应用本试剂盒，检测14个小鼠血清样品中人、小鼠、大鼠PIP5K1A的浓度。

样本类型	均值 (ng/mL)	范围 (ng/mL)
小鼠血清 (n=14)	20.3	7.81-38.06

细胞裂解液:

	PIP5K1A / 总蛋白 (ng/mg)
HepG2 裂解液	56.2
Hela 裂解液	19.4
HEK293 裂解液	18.6

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PIP5K1A的灵敏度为0.008 ng/mL。

9.6 线性

人血浆和大鼠血清加入高浓度的人、小鼠、大鼠PIP5K1A蛋白，梯度稀释后检测样本加标线性，小鼠血清以及细胞裂解液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：

样本类型	稀释倍数	范围 (%)	均值 (%)
人血浆 (样本稀释液 PT 4-af)	1:2	105-111	108
	1:4	119-126	122
	1:8	112-117	114
	1:16	101-103	102
小鼠血清 (样本稀释液 PT 1-ef)	1:25	-	100
	1:50	115-126	121
	1:100	95-111	103
	1:200	70-75	73
大鼠血清 (样本稀释液 PT 3-ec)	1:2	78-89	84
	1:4	87-104	96
	1:8	99-108	104
	1:16	102-106	104
细胞裂解液 (样本稀释液 PT 3-ec)	1:8	-	100
	1:16	97-108	104
	1:32	97-109	105
	1:64	106-110	108

9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人、小鼠、大鼠PIP5K1A

十：参考文献

1. Ling KH. et al. (2007). *In Silico Biol.* 7(1):115-121.
2. Sun Y. et al. (2011). *PLoS One.* 6(11):e27227.