版本号： Datasheet-KE00761-A.0

生效日期： 2025-05-27

人PLSCR1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： KE00761

规 格： 96T

灵敏度： 0.02 ng/mL

检测范围: 0.156-10 ng/mL

用 途： 此试剂盒用于定量检测尿液、细胞裂解液以及组织裂解液中的人PLSCR1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

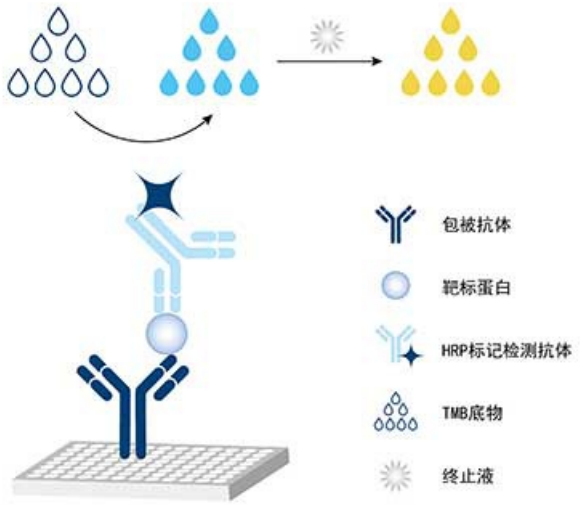
一：背景信息 3
二：检测原理 3
三：需自备的实验器材 3
四：试剂盒组分及储存 4
五：实验注意事项 4
六：样本准备 5
七：试剂准备 5
八：实验步骤 6
九：实验参数 7
9.1 参考标曲图 7
9.2 精密度 7
9.3 加标回收率 8
9.4 样本值 8
9.5 灵敏度 8
9.6 线性 9
9.7 特异性 9
十：参考文献 9

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

一：背景信息

PLSCR1（磷脂扰乱酶 1）是介导磷脂跨膜运动的膜蛋白家族成员之一，PLSCR1是一种在钙依赖方式下发挥功能的 II 型跨膜蛋白，参与钙依赖性的非特异性、快速磷脂重新分布过程。PLSCR1 的 [184CCCPCC189] 区域是一种富含半胱氨酸的棕榈酰化基序，通过与半胱氨酸的硫基羟形成硫酯键，控制 PLSCR1 运输至细胞膜或细胞核。 干扰素（IFN）处理和病毒感染时，PLSCR1会强烈表达。

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 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 尿液: 收集尿液后，1000×g离心20 min，取上清，立即使用或分装后-20°C存放，避免反复冻融。

6.2 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。

6.3 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 μL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 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 990uL **抗体稀释液**进行配制，轻轻混匀。

7.3 待检测样本：

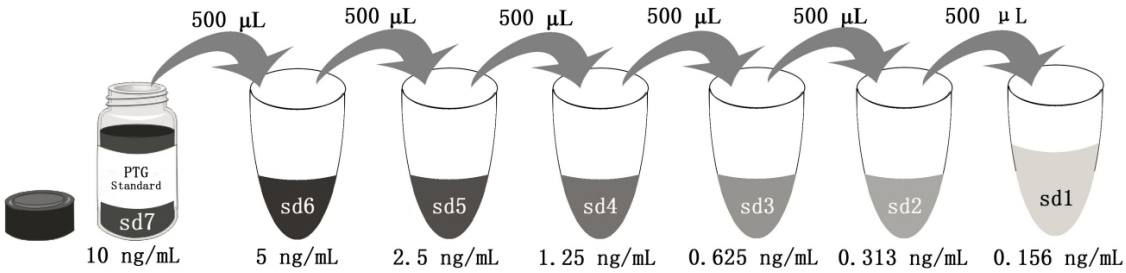
不同的样本使用相应的样本稀释液进行稀释，如果样本检测值超过标曲最高范围，可将样本进行一定的稀释后再进行实验，使样本的检测值处于标曲范围内，不同样本的稀释倍数需自行优化。

稀释比推荐如下：尿液样本1:2或1:4稀释；裂解液样本1:32或1:64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

使用2 mL PT 4B1 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 4B1	**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×）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。

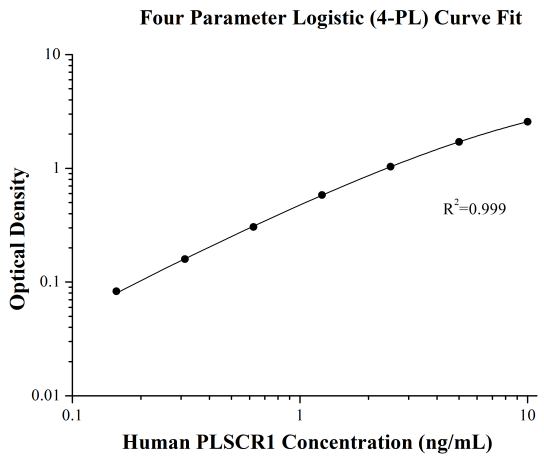
USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

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℃孵育
2	HRP标记检测抗体（1×）	100 µL	40 分钟	4 次	覆膜后37℃孵育
3	显色 TMB	100 µL	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37℃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



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.0108 0.0104	0.011	-
0.156	0.0925 0.0945	0.094	0.083
0.313	0.1688 0.1698	0.169	0.159
0.625	0.3168 0.3143	0.316	0.305
1.25	0.59 0.5965	0.593	0.583
2.5	1.0421 1.0493	1.046	1.035
5	1.7251 1.7091	1.717	1.707
10	2.6066 2.5541	2.58	2.57

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	5.67	0.22	3.83
2	8	1.39	0.05	3.87
3	8	0.65	0.04	5.51

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	6.02	0.48	7.97
2	16	1.36	0.06	4.21
3	16	0.69	0.05	7.07

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PLSCR1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 (%)
尿液	1:16	94	89-100
	1:32	94	90-98
裂解液	1:256	93	88-98

9.4 样本值

尿液 - 应用本试剂盒，检测尿液样本中人PLSCR1的浓度。

样本类型	均值 (ng/mL)	范围 (ng/mL)
尿液样本 (n=8)	7.44	1.34-15.39

细胞/组织裂解液

	人PLSCR1 (ng/mL)	总蛋白量 (mg/mL)
HEK-293细胞裂解液	74.58	2.90
HepG2细胞裂解液	23.05	0.90
SH-SY5Y细胞裂解液	3.14	2.60
人胎盘组织裂解液	80.13	2.40

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PLSCR1的灵敏度为0.02 ng/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：

（裂解液样本预先稀释16倍。）

		尿液	裂解液
1:2	均值（%）	100	100
	范围（%）	-	-
1:4	均值（%）	108	105
	范围（%）	104-113	99-110
1:8	均值（%）	115	115
	范围（%）	112-119	106-123
1:16	均值（%）	113	104
	范围（%）	108-115	88-129

9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人PLSCR1。

十：参考文献

1. Chen, Yan et al. Blood vol. 121,18 (2013): 3682-91.
2. Huang, Panpan et al. Theranostics vol. 10,10 (2020):4644-4658.
3. Sadanari, Hidetaka et al. Microbiology spectrum vol. 10,1 (2022): e0134221.

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