

Speedy™ 人/小鼠/大鼠S100B一步法ELISA检测试剂盒

请在实验前仔细阅读本说明书

产品货号: SE50043
规格: 96T
灵敏度: 0.02 ng/mL
检测范围: 0.25-16 ng/mL
用途: 此试剂盒用于定量检测组织裂解液和脑脊液中的人/小鼠/大鼠S100B浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

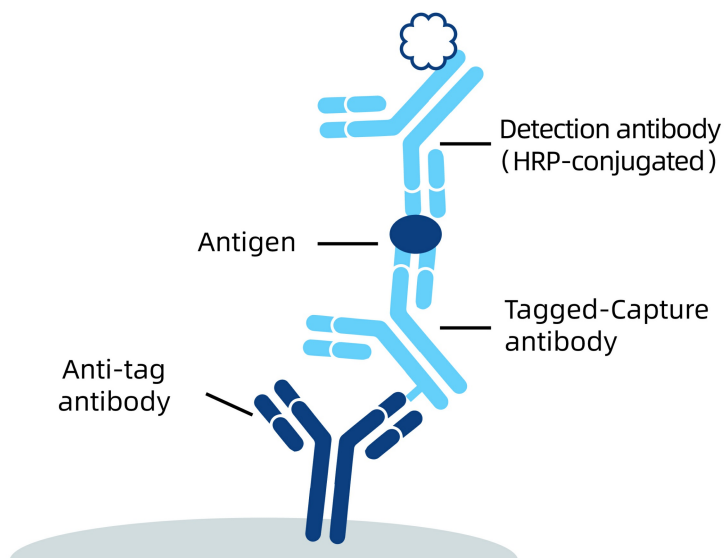
目录

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	8
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

一：背景信息

S100B 是 S100 蛋白家族的成员，其中包含 2 个 EF 手钙结合基序，并参与调节细胞活动，如代谢、运动和增殖。S100B 在大脑中的星形胶质细胞中高度表达。它也在周围神经系统的雪旺细胞中表达，在神经系统外的黑色素细胞、脂肪细胞和软骨细胞中表达。头部外伤、蛛网膜下腔出血和中风后报告的脑脊液和血清中 S100B 水平升高与脑损伤程度相关。据报道，血清 S100B 升高与脑转移之间存在关联。在脑小血管病 (SVD) 患者中也可能发现 S100B 水平升高。

二：检测原理



抗标签抗体预先包被于板孔，可结合带标签的捕获抗体。抗原或样本、捕获抗体及辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的检测抗体加入后，在溶液中形成夹心复合物。在 HRP 催化下，四甲基联苯胺 (TMB) 使底物溶液由无色变蓝，加入终止液后变黄。溶液颜色深浅与结合蛋白量成正比。测量波长为 450 nm，校正波长为 630 nm。

三：需自备的实验器材

- 3.1 酶标仪 (可读取 450nm 和 630nm 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, 也可使用 Proteintech 公司数据分析网站: <https://www.ptgcn.com/products/elisa-kits/>;
- 3.8 微孔板恒温振荡器。

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 *	32 ng/瓶	2 瓶
Capture antibody (100×)	捕获抗体浓缩液 (100×) **	60 μL/支	1 支
Detection antibody, HRP-conjugated (100×)	HRP 标记检测抗体浓缩液 (100×) **	60 μL/支	1 支
Sample Diluent PT 4B1	样本稀释液 PT 4B1	30 mL/瓶	2 瓶
Detection Diluent	抗体稀释液	15 mL/瓶	1 瓶
Wash Buffer Concentrate (20×)	浓缩洗涤液 (20×)	30 mL/瓶	1 瓶
Extraction Reagent	裂解液	15 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，详见7.4部分，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 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 $8000\times\text{g}$ - $10000\times\text{g}$ 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 脑脊液: 收集脑脊液后 $10000\times\text{g}$ 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。

七：试剂准备

7.1 洗涤液 (1×) 的配制:

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1×洗涤液。

7.2 抗体混合液 (1×) 的配制:

开盖前瞬时离心, 将捕获抗体和检测抗体稀释分别按1:100比例稀释到同一管稀释液中, 配制成检测所需的工作液。例如: 将50 μL 包被抗体浓缩液 (100×) 和50 μL 检测抗体浓缩液 (100×) 加入 4900 μL 抗体稀释液, 混匀配制成1×抗体混合液。

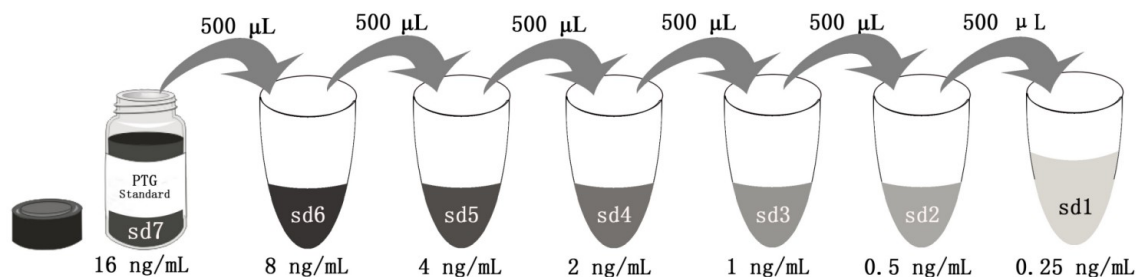
7.3 待检测样本:

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: 组织裂解液样本1:32000或1:64000稀释; 脑脊液样本1:4或1:8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 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20-30 min (捕获抗体浓缩液和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50 µL，余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本50 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 每孔加50 µL 抗体混合液 (1×) (参照试剂准备部分7.2)，盖上封板膜，恒温振荡器上37°C 400 rpm 孵育 1 h (若无恒温振荡器，此步骤建议37°C静置孵育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；

8.5 显色：每孔加TMB显色液100 µL，恒温振荡器上37°C 400 rpm 孵育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)；

8.6 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)

8.7 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；

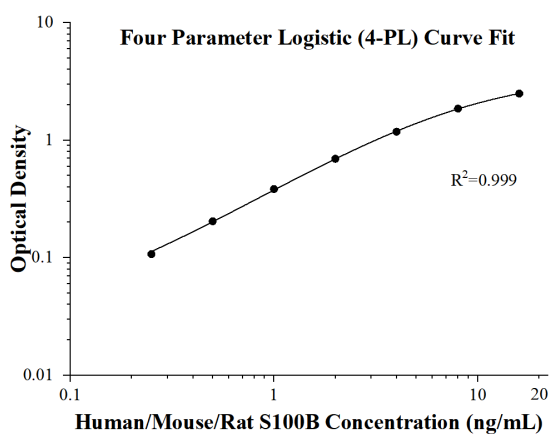
8.8 数据分析：每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD值为纵坐标，使用专业软件 (如Origin、ELISACalc等) 进行四参数拟合 (4-PL)，根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

操作流程如下：



九：实验参数

9.1 参考标曲图



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.077 0.0741	0.07555	-
0.25	0.1828 0.1831	0.18295	0.1074
0.5	0.2849 0.2751	0.28	0.20445
1	0.4621 0.4587	0.4604	0.38485
2	0.768 0.7747	0.77135	0.6958
4	1.2527 1.2628	1.25775	1.1822
8	1.9393 1.9285	1.9339	1.85835
16	2.5618 2.5872	2.5745	2.49895

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)					板间精密度 (CV间)				
样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%	样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%
1	8	7.98	0.19	2.38	1	16	7.91	0.22	2.78
2	8	2.01	0.08	3.98	2	16	2.01	0.08	3.98
3	8	0.61	0.04	6.56	3	16	0.60	0.04	6.67

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S100B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 (%)
组织裂解液	1:16000	107	105-110
	1:32000	106	104-109
脑脊液	1:16	113	110-115
	1:32	111	109-112

9.4 样本值

组织裂解液

	S100B ($\mu\text{g/mL}$)	总蛋白量 (mg/mL)
小鼠脑组织裂解液	19.99	7.00
大鼠脑组织裂解液	201.50	8.20

脑脊液 - 应用本试剂盒, 检测人脑脊液样本中S100B的浓度, 测量均值为24.35 ng/mL。

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S100B的灵敏度为0.02 ng/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：

(组织裂解液样本预先稀释16000倍，脑脊液样本预先稀释2倍。)

		组织裂解液	脑脊液
1:2	均值 (%)	100	100
	范围 (%)	-	-
1:4	均值 (%)	83	105
	范围 (%)	82-84	104-106
1:8	均值 (%)	78	106
	范围 (%)	73-82	105-107
1:16	均值 (%)	86	102
	范围 (%)	84-88	101-104

9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人/小鼠/大鼠S100B，加入50 ng/mL以下细胞因子，无明显交叉反应。

Human:

APRIL

TNF- α

TNF- β

TRAIL

十：参考文献

1. Donato, R. The international journal of biochemistry & cell biology vol. 33,7 (2001): 637-68.
2. Heizmann, Claus W et al. Frontiers in bioscience : a journal and virtual library vol. 7 (2002): d1356-68.
3. Kanner, Andrew A et al. Cancer vol. 97,11 (2003): 2806-13.
4. Vogelbaum, Michael A et al. Cancer vol. 104,4 (2005): 817-24.