

## 人Thrombospondin 1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: KE00249

规格: 96T

灵敏度: 0.002 ng/mL

检测范围: 0.137-100 ng/mL

用途: 此试剂盒用于定量检测血清、血浆、细胞上清、唾液以及母乳中人Thrombospondin 1浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

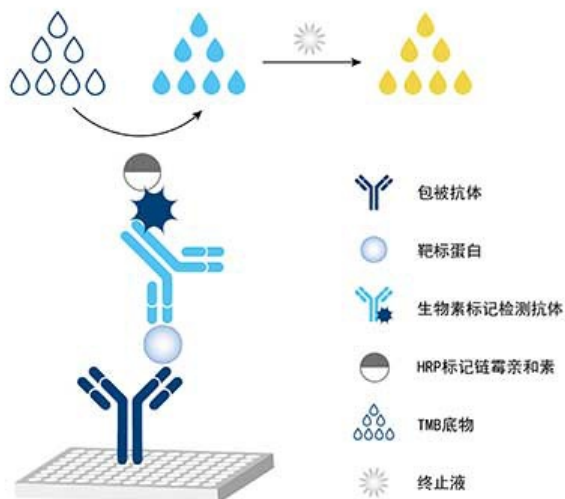
## 目录

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	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
十：参考文献	9

## 一：背景信息

血小板反应蛋白1(Thrombospondin 1)，一种细胞外基质蛋白，是第一个被鉴定的天然血管生成抑制剂。多种正常细胞，包括内皮细胞、成纤维细胞、脂肪细胞、平滑肌细胞、单核细胞、巨噬细胞和转化细胞等恶性胶质瘤细胞都分泌Thrombospondin 1。该蛋白参与许多生理和病理过程，包括通过多种细胞受体的细胞间相互作用以及细胞-基质相互作用。它与多种整合素和非整合素细胞表面受体结合。Thrombospondin 1也是一种体内关键的转化生长因子(TGF $\beta$ 1)的主要激活因子，它通过激活TGF- $\beta$ 1导致各种器官纤维化的发生。

## 二：检测原理



### ◀双抗夹心模式图 (检测抗体标记生物素)

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 *	100 ng/瓶	2 瓶
Detection antibody, biotinylated (100×)	生物素标记检测抗体浓缩液 (100×) **	120 μL/支	1 支
Streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) (100×)	HRP标记链霉亲和素浓缩液 (100×) **	120 μL/支	1 支
Sample Diluent PT 3	样本稀释液 PT 3	30 mL/瓶	2 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
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 细胞上清: 收集细胞培养液, 500×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。
- 6.4 唾液: 收集唾液后10000×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。
- 6.5 母乳: 收集样本后, 在2-8°C条件下1000×g离心15 min, 取澄清部分, 重复此过程2次, 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×)：

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 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标记链霉亲和素 (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标记的链霉亲和素浓缩液 (100×) 加 990 μL 抗体稀释液进行配制, 轻轻混匀。

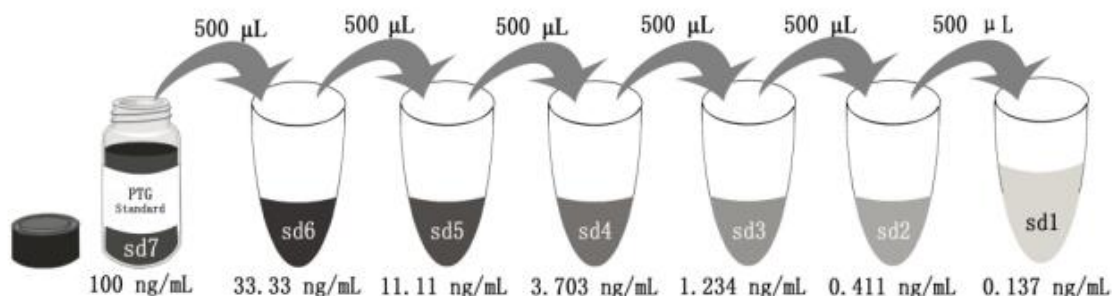
### 7.4 待检测样本：

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1:3000或1:6000稀释; 细胞上清1:200或1:400稀释; 唾液1:30或1:60稀释; 母乳1:30或1:60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：

使用1 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	1000 μL	1000 μL	1000 μL	1000 μL	1000 μL	1000 μL	1000 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标记链霉亲和素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标记链霉亲和素(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;

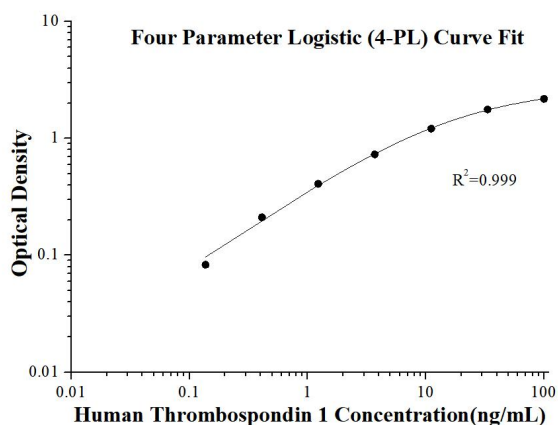
8.12 数据分析:每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值,设置复孔,取其平均值。以标准品的浓度为横坐标,OD 值为纵坐标,使用专业软件(如Origin、ELISACalc等)进行四参数拟合(4-PL),根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度,乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

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 μL	120 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
2	检测抗体(1×)	100 μL	60 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
3	HRP标记链霉亲和素(1×)	100 μL	40 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
4	显色 TMB	100 μL	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37°C孵育,避光
5	终止液	100 μL	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	0.061 0.06	0.061	-
0.137	0.142 0.145	0.144	0.083
0.411	0.271 0.272	0.272	0.211
1.234	0.459 0.479	0.469	0.409
3.703	0.788 0.79	0.789	0.729
11.11	1.259 1.282	1.271	1.210
33.33	1.842 1.814	1.828	1.768
100	2.215 2.256	2.236	2.175

### 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	44.43	4.17	9.4
2	20	3.71	0.31	8.3
3	20	0.31	0.03	9.6

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	36.57	3.67	10.0
2	24	3.66	0.20	5.5
3	24	0.34	0.03	8.3

### 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Thrombospondin 1的加标回收率实验，结果如下：

样本类型	稀释倍数	均值(%)	范围(%)
人血清	1:3000	84	75-101
	1:6000	78	70-84
细胞上清	1:300	87	72-100
	1:600	88	83-96
唾液	1:30	80	70-101
	1:60	88	77-117
母乳	1:100	95	83-114
	1:200	81	77-93

### 9.4 样本值

应用本试剂盒，检测健康人样本中的人Thrombospondin 1的浓度。

样本类型	均值 (ng/mL)	范围 (ng/mL)
人血清 (n=16)	11735	3398-38176
唾液 (n=8)	88.5	14.3-235.5
母乳 (n=6)	123.8	39.9-307.5

#### 细胞上清：

HUVEC在含有10%胎牛血清、2.5 mM L-谷氨酰胺、100 U/mL青霉素和100 µg/mL硫酸链霉素的DMEM中培养。收集细胞上清，检测人Thrombospondin 1的浓度为 773 ng/mL。

在含有 10% 胎牛血清、50 µM β-巯基乙醇、2 mM L-谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素和 100µg/mL 硫酸链霉素的 RPMI 培养基中培养人外周血单个核细胞PBMC (1 x 10<sup>6</sup> cells/mL)。用 10 µg/mL 植物血凝素PHA 刺激细胞。在第 3 天收集细胞上清，并检测人Thrombospondin 1 的浓度。

刺激条件	3天 (ng/mL)
未刺激	3176
刺激	2059

### 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Thrombospondin 1的灵敏度为 0.002 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：

(人血清预先稀释800倍，细胞上清预先稀释120倍，唾液预先稀释8倍，母乳预先稀释8倍)

稀释倍数		人血清	细胞上清	唾液	母乳
1:2	均值(%)	100	100	100	100
	范围(%)	-	-	-	-
1:4	均值(%)	107	103	107	99
	范围(%)	99-114	94-112	101-112	96-102
1:8	均值(%)	113	113	101	95
	范围(%)	105-123	111-115	100-103	94-98
1:16	均值(%)	113	121	112	104
	范围(%)	104-123	115-124	106-117	97-116

## 十：参考文献

1. J C Adams. et al. (1997) Int J Biochem Cell Biol.29(6):861-5.
2. H Chen. et al. (2000) Matrix Biol. 19(7):597-614.
3. S E Crawford. et al. (1998) Cell. Jun 26;93(7):1159-70.
4. Andrea Resovi. et. al.(2014)Matrix Biol.37:83-91.
5. Zenaida Lopez-Dee. et al. (2011) Mediators Inflamm. 2011:296069.