

## 小鼠KIM-1/HAVCR1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: KE10105

规格: 96T

灵敏度: 1.1 pg/mL

检测范围: 7.8-500 pg/mL

用途: 此试剂盒用于定量检测血清、血浆、细胞上清以及尿液中的小鼠KIM-1/HAVCR1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  | 8  |
| 9.4 样本值    | 8  |
| 9.5 灵敏度    | 9  |
| 9.6 线性     | 9  |
| 9.7 特异性    | 9  |
| 十：参考文献     | 10 |

## 一：背景信息

肾损伤分子1 (KIM-1)，也称为甲型肝炎病毒细胞受体1 (HAVCR1) 或T细胞免疫球蛋白和黏蛋白结构域蛋白1 (TIM-1)，是一种型跨膜糖蛋白，属于免疫球蛋白超家族，其胞外段包含免疫球蛋白结构域和一个黏蛋白结构域。KIM-1是甲型肝炎病毒 (HAV) 的膜受体。KIM-1为T细胞激活提供共刺激信号，并抑制外周耐受性的发展。KIM-1可能参与哮喘和过敏性疾病的调节。据报道，在急性肾损伤时KIM-1的表达显著增高，其胞外段脱落为可溶性片段释放排入尿液，成为肾小管损伤的一个标志物。

## 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。

## 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 *           | 1000 pg/瓶 | 2 瓶 |
| Detection antibody, HRP-conjugated (100×) | HRP标记检测抗体浓缩液 (100×) ** | 120 μL/支  | 1 支 |
| Sample Diluent PT 3-ef                    | 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 |
| 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 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。

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

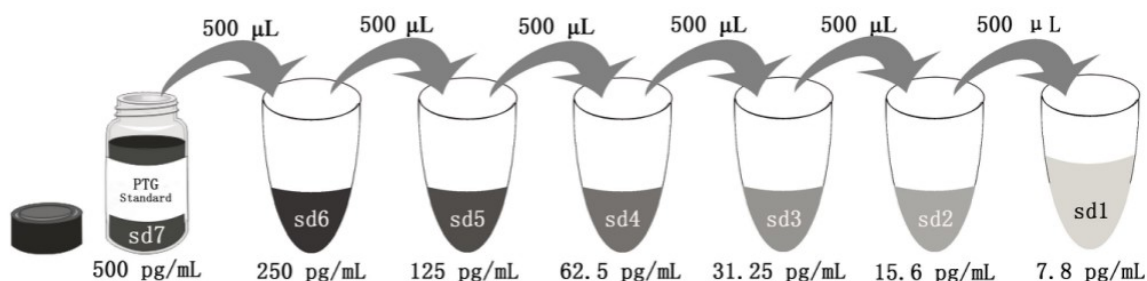
### 7.3 待检测样本：

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: 小鼠血清和血浆样本1:2或1:4稀释; 细胞上清样本1:8或1:16稀释; 尿液样本1:160或1:320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：

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"  |

## 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；

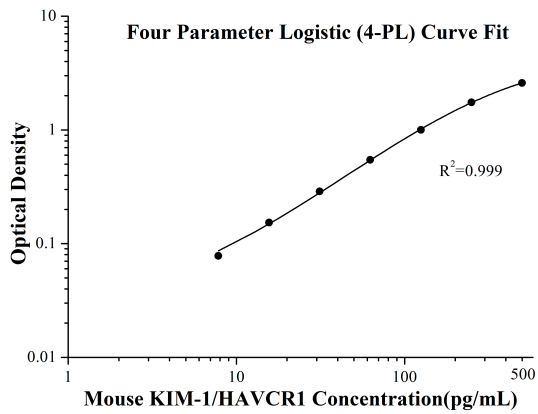
8.10 数据分析：每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD值为纵坐标，使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

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 |        |          |       |              |

## 九：实验参数

### 9.1 参考标曲图



| (pg/mL) | O.D              | Average | Corrected |
|---------|------------------|---------|-----------|
| 0       | 0.043<br>0.0465  | 0.045   | -         |
| 7.8     | 0.1189<br>0.1264 | 0.123   | 0.078     |
| 15.6    | 0.191<br>0.2048  | 0.198   | 0.153     |
| 31.25   | 0.3255<br>0.3396 | 0.333   | 0.288     |
| 62.5    | 0.5868<br>0.5963 | 0.592   | 0.547     |
| 125     | 1.0409<br>1.0523 | 1.047   | 1.002     |
| 250     | 1.7372<br>1.8511 | 1.794   | 1.749     |
| 500     | 2.6446<br>2.6256 | 2.635   | 2.590     |

### 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 (pg/mL) | 标准差 | 变异系数CV% |
| 1           | 20 | 12.3        | 0.9 | 7.6     |
| 2           | 20 | 54.3        | 1.1 | 2.1     |
| 3           | 20 | 238.1       | 5.2 | 2.2     |

| 板间精密度 (CV间) |    |             |      |         |
|-------------|----|-------------|------|---------|
| 样本          | 数量 | 平均值 (pg/mL) | 标准差  | 变异系数CV% |
| 1           | 24 | 15.4        | 1.4  | 8.8     |
| 2           | 24 | 57.2        | 3.8  | 6.7     |
| 3           | 24 | 247.2       | 12.0 | 4.8     |

### 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，进行小鼠KIM-1/HAVCR1的加标回收率实验，结果如下：

| 样本类型 | 稀释倍数   | 均值(%) | 范围(%) |
|------|--------|-------|-------|
| 小鼠血清 | 1:8    | 87    | 79-92 |
|      | 1:16   | 81    | 77-89 |
| 细胞上清 | 1:32   | 83    | 75-92 |
|      | 1:64   | 81    | 77-88 |
| 尿液   | 1:640  | 85    | 78-90 |
|      | 1:1280 | 84    | 77-93 |

### 9.4 样本值

小鼠血清 - 应用本试剂盒，检测小鼠血清样本中小鼠KIM-1/HAVCR1的浓度。

| 样本类型        | 均值 (pg/mL) | 范围 (pg/mL) |
|-------------|------------|------------|
| 小鼠血清 (n=16) | 143.3      | 97.7-240.5 |

尿液 - 应用本试剂盒，检测小鼠尿液样本中小鼠KIM-1/HAVCR1的浓度。

| 样本类型     | 均值 (ng/mL) | 范围 (ng/mL) |
|----------|------------|------------|
| 尿液 (n=5) | 12.7       | 1.6-25.8   |

细胞上清 - 取小鼠肾脏组织，使用 1X PBS 进行冲洗，将其浸泡在 1X PBS 中并置于冰上保存。随后使用组织匀浆器将小鼠肾脏组织匀浆并接种于含有 10% 胎牛血清、2 mM L-谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 硫酸链霉素的 RPMI-1640 培养基中，按照既定时间进行培养。收集细胞上清，并检测小鼠 KIM-1/HAVCR1 的浓度。

| 组织类型              | (pg/mL) |
|-------------------|---------|
| Balb/c 小鼠肾脏 (3 天) | 602.5   |
| C57 小鼠肾脏 (3 天)    | 724.5   |

## 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，此试剂盒中小鼠KIM-1/HAVCR1的灵敏度为 1.1 pg/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：

(细胞上清样本预先稀释4倍，尿液样本预先稀释80倍)

| 稀释倍数 |        | 小鼠血清    | 细胞上清   | 尿液      |
|------|--------|---------|--------|---------|
| 1:2  | 均值 (%) | 100     | 100    | 100     |
|      | 范围 (%) | -       | -      | -       |
| 1:4  | 均值 (%) | 104     | 98     | 98      |
|      | 范围 (%) | 99-107  | 92-103 | 95-103  |
| 1:8  | 均值 (%) | 107     | 105    | 103     |
|      | 范围 (%) | 103-110 | 94-117 | 100-108 |
| 1:16 | 均值 (%) | 108     | 107    | 107     |
|      | 范围 (%) | 102-119 | 96-113 | 100-115 |

## 9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组小鼠KIM-1/HAVCR1，加入50 ng/mL以下细胞因子，无明显交叉反应。

|                  |                   |                   |
|------------------|-------------------|-------------------|
| Mouse:           | Human:            | Rat:              |
| Cystatin C       | TIM-1/KIM-1/HAVCR | Lipocalin-2/NGAL  |
| Lipocalin-2/NGAL | TIM-3             | TIM-1/KIM-1/HAVCR |
| MMP-2            |                   |                   |
| MMP-3            |                   |                   |
| MMP-9            |                   |                   |

## 十：参考文献

1. Feigelstock D, et al. The human homolog of HAVcr-1 codes for a hepatitis A virus cellular receptor. *J Virol.* 72(8):6621-8 (1998).
2. Kaplan G, et al. Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. *EMBO J.* 15(16):4282-96 (1996).
3. de Souza AJ, et al. T cell Ig and mucin 1 (TIM-1) is expressed on in vivo-activated T cells and provides a costimulatory signal for T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(47):17113-8 (2005).
4. Umetsu SE, et al. TIM-1 induces T cell activation and inhibits the development of peripheral tolerance. *Nat Immunol.* 6(5):447-54 (2005).
5. McIntire JJ, et al. Immunology: hepatitis A virus link to atopic disease. *Nature.* 425(6958):576 (2003).
6. Ichimura T, et al. Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 286(3):F552-63 (2004).