

Speedy™ 小鼠/大鼠IGFBP2一步法ELISA检测试剂盒

请在实验前仔细阅读本说明书

产品货号: SE60032
规格: 96T
灵敏度: 0.05 ng/mL
检测范围: 0.313-20 ng/mL
用途: 此试剂盒用于定量检测血清和血浆中小鼠/大鼠IGFBP2浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

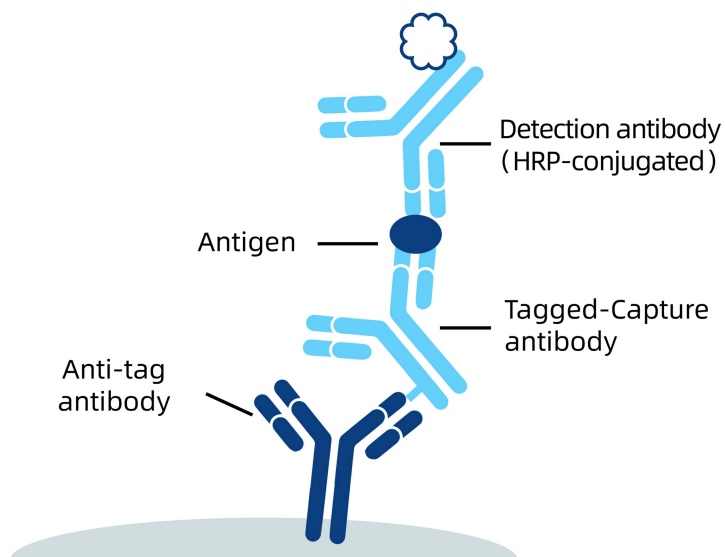
目录

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	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

IGFBP2（胰岛素样生长因子结合蛋白2）是一种分泌性蛋白，属于IGF结合蛋白家族，广泛参与细胞生长、分化、凋亡及肿瘤进展等多种生物学过程。它通过与IGF-I和IGF-II结合，调节IGF信号通路的活性，延长IGF的半衰期，并影响其生物可用性。IGFBP2在多种疾病中表现出异常表达，特别是在肿瘤中，其高表达与肿瘤的恶性进展、转移和预后不良密切相关。此外，IGFBP2在神经修复、能量代谢和细胞增殖等生理过程中也发挥重要作用。例如，它能够促进神经元再生和神经胶质细胞增殖，改善胰岛素抵抗，并调节细胞周期。在肿瘤领域，IGFBP2既可作为潜在的诊断标志物，也可作为治疗靶点。

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 *	40 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	1 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
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 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℃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℃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)。

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。

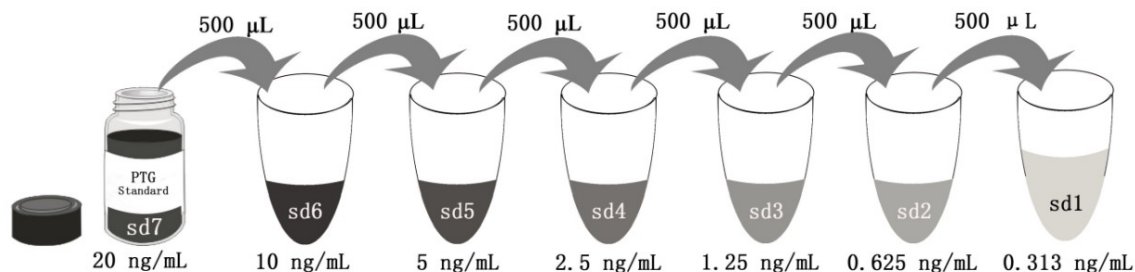
7.3 待检测样本:

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: 小鼠血清和血浆样本1:20或1:40稀释; 大鼠血清和血浆样本1:10或1:20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 μ L,余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本50 μ L/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 μ L 抗体混合液(1 \times)(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 \times)洗涤板条,每孔350-400 μ L,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 μ L,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 μ L,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;

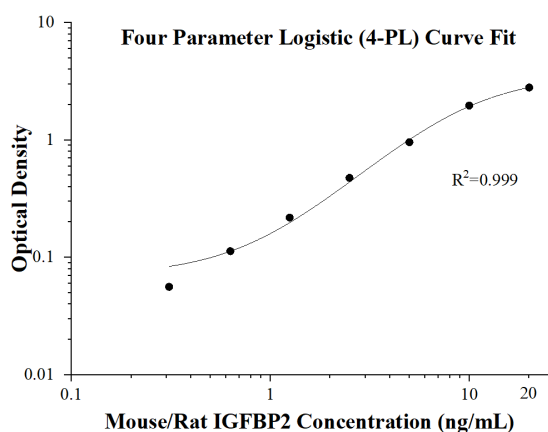
8.8 数据分析:每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值,设置复孔,取其平均值。以标准品的浓度为横坐标,OD值为纵坐标,使用专业软件(如Origin、ELISACalc等)进行四参数拟合(4-PL),根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度,乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

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	0.0197 0.0178	0.01875	-
0.313	0.0779 0.0719	0.0749	0.05615
0.625	0.1349 0.1282	0.13155	0.1128
1.25	0.2377 0.237	0.23735	0.2186
2.5	0.5127 0.4763	0.4945	0.47575
5	0.9813 0.9715	0.9764	0.95765
10	2.0103 1.9638	1.98705	1.9683
20	2.8204 2.8167	2.81855	2.7998

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	11.14	0.29	2.60	1	16	11.12	0.24	2.16
2	8	2.74	0.05	1.82	2	16	2.71	0.09	3.32
3	8	1.40	0.05	3.57	3	16	1.38	0.07	5.07

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IGFBP2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 (%)
小鼠血清	1:160	115	110-119
大鼠血清	1:40	119	119-120
	1:80	115	112-117

9.4 样本值

小鼠血清/大鼠血清 - 应用本试剂盒, 检测小鼠血清和大鼠血清样本中小鼠/大鼠IGFBP2的浓度。

样本类型	均值 (ng/mL)	范围 (ng/mL)
小鼠血清样本 (n=16)	236.35	103.22-494.43
大鼠血清样本 (n=8)	57.87	32.83-73.31

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/大鼠IGFBP2的灵敏度为0.05 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：

(小鼠血清样本预先稀释10倍，大鼠血清样本预先稀释5倍。)

		小鼠血清	大鼠血清
1:2	均值 (%)	100	100
	范围 (%)	-	-
1:4	均值 (%)	98	114
	范围 (%)	97-99	111-116
1:8	均值 (%)	93	117
	范围 (%)	92-95	107-126
1:16	均值 (%)	86	112
	范围 (%)	84-88	102-121

9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组大小鼠IGFBP2。

十：参考文献

1. Wang Z. et al. (2024) Dev Cell. 59(20):2787-2803.
2. Lu H. et al. (2024) Cell Death Dis. 15(6):447.
3. Shahin WS. et al. (2023) Nat Commun. 14(1):444.
4. Lin YH. et al. (2023) Cell Stem Cell. 30(5):665-676.e4.