

## 人GRP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: KE00070  
规格: 96T  
灵敏度: 0.03 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、血浆以及细胞上清中人GRP浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

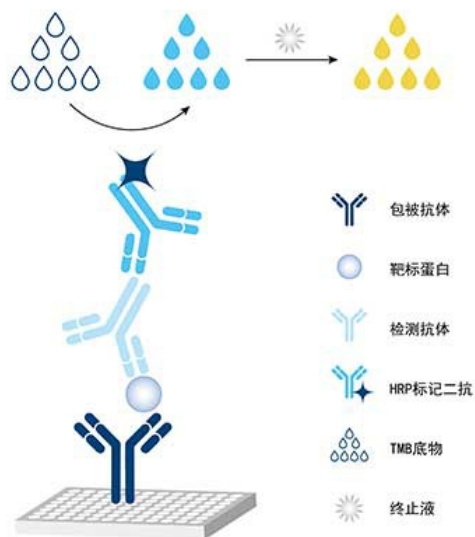
## 目录

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 灵敏度	8
9.5 线性	8
十：参考文献	8

## 一：背景信息

胃泌素释放肽（Gastrin-releasing peptide, GRP）是一种胃肠激素，广泛分布于哺乳动物的神经系统、胃肠道和呼吸道，其主要功能是刺激胃的G细胞分泌胃泌素。随着信号肽解离，它的148个氨基酸的前蛋白原进一步分解生成27个氨基酸的胃泌素释放肽（GPR）和68个氨基酸的胃泌素释放肽前体（ProGRP）。这些较小的胃泌素释放肽（GPR）可调节胃肠道和中枢神经系统的许多功能，包括胃肠道激素的释放、平滑肌细胞收缩和上皮细胞增殖。另外，GRP也可能在人类肺癌、结肠癌、胃癌、胰腺癌、乳腺癌和前列腺癌中发挥作用。

## 二：检测原理



### ◀双抗夹心模式图 (检测抗体不标记)

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 *	40 ng/瓶	2 瓶
Detection antibody (100×)	检测抗体浓缩液 (100×) **	120 μL/支	1 支
HRP-conjugated antibody (100×)	HRP标记二抗浓缩液 (100×) **	120 μL/支	1 支
Sample Diluent PT 1-ec	样本稀释液 PT 1-ec (用于人血清、血浆样本)	30 mL/瓶	1 瓶
Sample Diluent PT 1-dg	样本稀释液 PT 1-dg (用于细胞上清样本)	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
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，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）。
- 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℃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 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标记二抗 (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标记二抗浓缩液 (100×) 加 990 μL 抗体稀释液进行配制, 轻轻混匀。

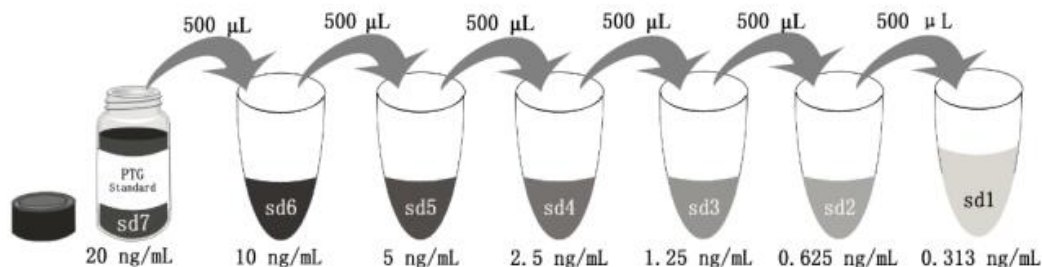
### 7.4 待检测样本：

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: 人血清和血浆样本1:2或1:4稀释; 细胞上清样本1:2或1:4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：

检测人血清和血浆样本, 使用2 mL PT 1-ec 样本稀释液复溶标准品; 检测细胞上清样本, 使用2 mL PT 1-dg 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 1-ec or PT 1-dg	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(检测抗体 浓缩液、HRP标记二抗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1 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标记二抗(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;

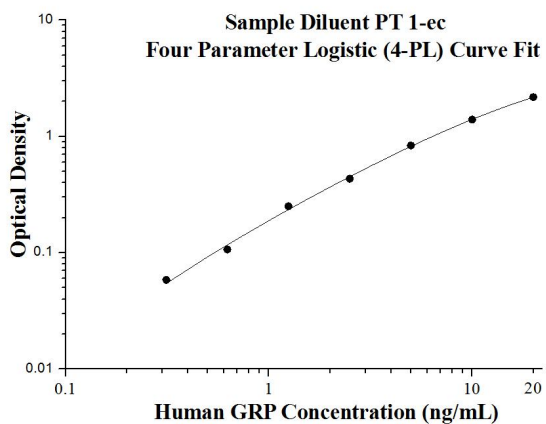
8.12 数据分析:每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值,设置复孔,取其平均值。以标准品的浓度为横坐标,OD 值为纵坐标,使用专业软件(如Origin、ELISACalc等)进行四参数拟合(4-PL),根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度,乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

### 操作流程如下:

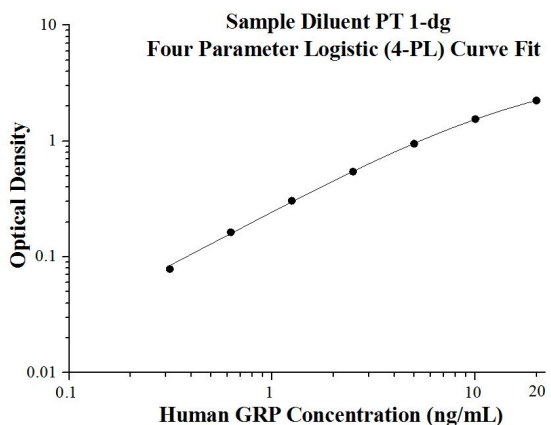
步骤	试剂	体积	孵育时间	洗涤次数	孵育温度
1	标准品或样本	100 μL	60 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
2	检测抗体(1×)	100 μL	60 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
3	HRP标记二抗(1×)	100 μL	40 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
4	显色 TMB	100 μL	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37°C孵育,避光
5	终止液	100 μL	0 分钟	不需要洗涤	-
6	加入终止液后以630 nm为校正波长,在450 nm处测量OD值,此过程建议不超过5分钟				

## 九：实验参数

### 9.1 参考标曲图



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.067 0.045	0.056	-
0.313	0.124 0.105	0.1145	0.0585
0.625	0.179 0.146	0.1625	0.1065
1.25	0.304 0.31	0.307	0.251
2.5	0.513 0.464	0.4885	0.4325
5	0.93 0.853	0.8915	0.8355
10	1.492 1.409	1.4505	1.3945
20	2.35 2.112	2.231	2.175



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.046 0.05	0.048	-
0.313	0.13 0.123	0.1265	0.0785
0.625	0.22 0.202	0.211	0.163
1.25	0.353 0.353	0.353	0.305
2.5	0.612 0.573	0.5925	0.5445
5	0.984 1.008	0.996	0.948
10	1.575 1.61	1.5925	1.5445
20	2.276 2.294	2.285	2.237

### 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	13.3	0.90	6.9
2	20	4.6	0.20	4.6
3	20	1.1	0.06	5.3

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	13.8	0.70	4.9
2	24	3.4	0.30	7.8
3	24	0.6	0.05	8.8

### 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，进行人GRP的加标回收率实验，结果如下：

样本类型	稀释倍数	均值 (%)	范围 (%)
人血浆	1:4	106	86-123
	1:8	108	83-128
细胞上清	1:2	83	77-88
	1:4	98	95-103

### 9.4 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GRP的灵敏度为 0.03 ng/mL。

### 9.5 线性

人血浆和细胞上清样本加入高浓度的人GRP蛋白，梯度稀释后检测样本加标线性，线性数据如下：

(人血浆样本预先稀释2倍)

稀释倍数		人血浆 (样本稀释液 PT1-ec)	细胞上清 (样本稀释液 PT1-dg)
1:2	均值 (%)	94	88
	范围 (%)	85-103	81-94
1:4	均值 (%)	111	118
	范围 (%)	94-123	116-119
1:8	均值 (%)	104	125
	范围 (%)	99-109	120-130
1:16	均值 (%)	123	108
	范围 (%)	113-133	106-109

## 十：参考文献

1. Baraniuk JN. et al. (1992) Neuropeptides. 21(2):81-4
2. Spindel ER. et al. (1984) Proc Natl Acad Sci U S A.81(18):5699-703
3. Gregory, R.A., et al. (1969) Gut 10: 603-608
4. Terashi, H., et al. (1998) J. Dermatol.Sci. 17: 93-100
5. "Entrez Gene: GRP gastrin-releasing peptide".provided by RefSeq, Jul 2008