

人、小鼠SMN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: KE00027
规格: 96T
灵敏度: 6.0 pg/mL
检测范围: 62.5 - 4000 pg/mL
用途: 此试剂盒用于定量检测人、小鼠细胞裂解液、组织裂解液中SMN浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

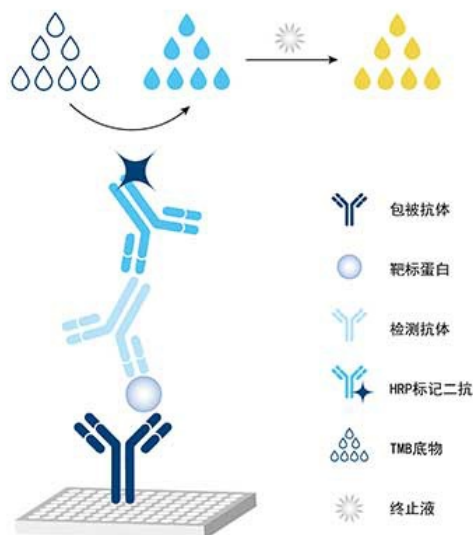
目录

一：背景信息	3
二：检测原理	3
三：需自备的实验器材	3
四：试剂盒组分及存储	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	8
9.6 线性	9
十：参考文献	9

一：背景信息

运动神经元存活蛋白（SMN）基因编码SMN蛋白，smn基因在脑、肾脏、肝脏和脊髓等多种组织中组成型表达，而运动神经元特别容易受到SMN蛋白水平的影响。若smn基因发生变异，则SMN蛋白的含量和活性降低，运动神经细胞可能发生萎缩甚至死亡，导致肌肉无力萎缩。大多数脊髓性肌萎缩症（SMA）的患者缺少有活性的SMN1，但拥有完整的SMN2。smn2与smn1高度同源，但smn2缺失smn1的7号外显子，因此SMN2无法单独提供足够的维持人体运动神经元生存所必需的全功能SMN蛋白。

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 超纯水或去离子水;
- 3.4 洗板机 (亦可手动洗板);
- 3.5 EP管 (用于稀释标准品及样本);
- 3.6 吸水毛巾或滤纸 (用于拍干);
- 3.7 烧杯和量筒;
- 3.8 100 mM PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride) 存储液 (1 g PMSF溶于57 mL异丙醇)，样本需要裂解才用;
- 3.9 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 *	8000 pg/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 3-af	样本稀释液 PT 3-af	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
Extraction Reagent	裂解液	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		3 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 细胞裂解液: 收集细胞后,用预冷(2-8°C)的1×PBS洗3次,500×g离心5 min。细胞计数,离心弃上清;加PMSF至细胞裂解液中,终浓度为1 mM;按每 1×10^7 个细胞,加入1 mL细胞裂解液(含PMSF),冰上裂解30 min,其间上下颠倒使裂解更充分,超声波破碎处理,8000×g-10000×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 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 μ L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×g-10000×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。

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 μ L/孔),实际配制时应多配制0.1-0.2 mL。如10 μ L 检测抗体浓缩液 (100×) 加 990 μ L 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 μ L/孔),实际配制时应多配制0.1-0.2 mL。如10 μ L HRP 标记二抗浓缩液 (100×) 加 990 μ L 抗体稀释液进行配制,轻轻混匀。

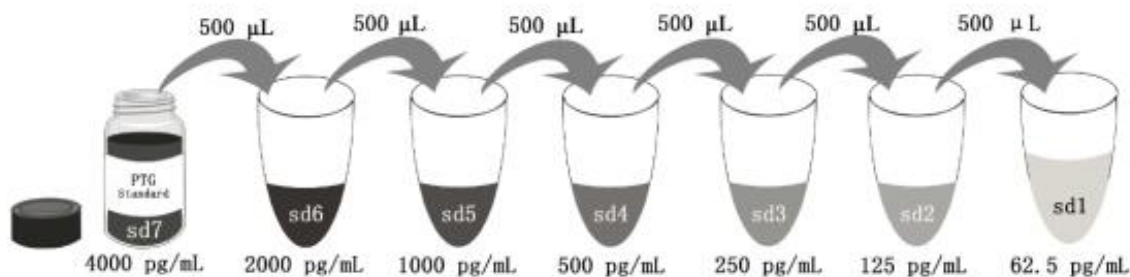
7.4 待检测样本:

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:细胞裂解液样本1:100稀释;组织裂解液样本1:2,1:4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。

7.5 梯度稀释的标准品:

使用2 mL PT 3-af 样本稀释液复溶标准品:



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-af	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 \times) 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 \times) (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 \times) (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;

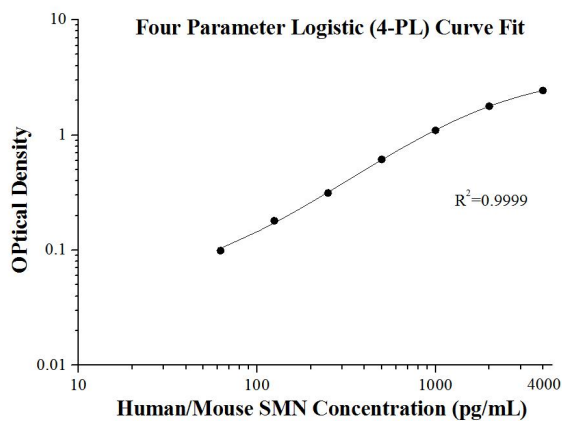
8.12 数据分析: 每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值, 设置复孔, 取其平均值。以标准品的浓度为横坐标, OD 值为纵坐标, 使用专业软件 (如Origin、ELISACalc等) 进行四参数拟合 (4-PL), 根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度, 乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

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 μ L	60分钟	4次	覆膜后37°C孵育
2	检测抗体 (1 \times)	100 μ L	60分钟	4次	覆膜后37°C孵育
3	HRP标记二抗 (1 \times)	100 μ L	40分钟	4次	覆膜后37°C孵育
4	显色 TMB	100 μ L	15-20分钟	不需要洗涤	覆膜后37°C孵育，避光
5	终止液	100 μ L	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



(pg/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.05 0.054	0.052	-
62.5	0.151 0.151	0.151	0.099
125	0.234 0.23	0.232	0.18
250	0.377 0.354	0.365	0.313
500	0.645 0.687	0.666	0.614
1000	1.134 1.167	1.1505	1.098
2000	1.818 1.84	1.829	1.777
4000	2.467 2.503	2.485	2.433

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	1,037.6	63.2	6.1
2	20	1,678.6	71.1	4.2
3	20	2,465.5	98.0	4.0

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	1,219.4	93.9	7.7
2	24	2,594.4	152.6	5.9
3	24	4,296	252.7	5.9

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SMN的加标回收率实验，结果如下：

样本类型	稀释倍数	加标浓度 (pg/mL)	均值 / 范围 (%)
细胞裂解液 (n=4)	1:2	2500	107 (106-108)
		1250	92 (90-93)
		125	82 (71-94)
	1:4	2500	89 (88-91)
		1250	89 (83-90)
		125	98 (88-108)
小鼠骨骼肌组织裂解液 (n=4)	1:8	2500	90 (90-91)
		1250	88 (83-93)
		125	107 (93-121)
	1:16	2500	107 (105-110)
		1250	104 (95-112)
		125	112 (97-127)

9.4 样本值

	小鼠骨骼肌裂解液	小鼠心脏裂解液	小鼠脑裂解液	小鼠肝脏裂解液	小鼠皮肤裂解液	SHSY5Y细胞裂解液	Colo320 细胞裂解液
SMN /总蛋白(pg/mg)	17.4	53.4	8.5	57.0	129.5	74	5524

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SMN的灵敏度为6.0 pg/mL。

9.6 线性

细胞裂解液、组织裂解液加入高浓度的人、小鼠SMN蛋白，梯度稀释后检测样本加标线性，线性数据如下：

稀释倍数		小鼠肌肉裂解液	人细胞裂解液
1:2	均值(%)	66	113
	范围(%)	62-71	101-124
1:4	均值(%)	79	111
	范围(%)	73-85	98-122
1:8	均值(%)	100	108
	范围(%)	100	100-116
1:16	均值(%)	114	98
	范围(%)	110-119	98-112

十：参考文献

1. Lefebvre S, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*. 80(1):155-65 (1995).
2. Gavrillov DK, et al. Differential SMN2 expression associated with SMA severity. *Nat Genet*. 20(3):230-1(1998).
3. Monani UR, et al. The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn(-/-)* mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*.9(3):333-9 (2000).
4. Burghes AH, et al. Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick ? *Nat Rev Neurosci*.10(8):597-609(2009).