

## 人EGFR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: KE00294

规格: 96T

灵敏度: 0.029 ng/mL

检测范围: 0.156-10 ng/mL

用途: 此试剂盒用于定量检测血清、血浆、细胞上清、母乳以及细胞裂解液中的人EGFR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	5
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	9
9.5 灵敏度	9
9.6 线性	10
9.7 特异性	10
十：参考文献	10

## 一：背景信息

表皮生长因子受体 (EGFR) 属于受体酪氨酸激酶 (RTK) 的 ErbB 家族，在上皮细胞生理学中发挥关键作用。EGFR 是酪氨酸激酶 (RTK) 的受体。它由具有激酶活性的 C 端细胞内区域和 N 端细胞外配体结合位点、疏水性跨膜结构域组成。EGFR 在不同类型的人类癌症中经常发生突变和/或过度表达，并且是目前临床实践中采用的多种癌症疗法的靶标。该基因的突变与肺癌有关。

## 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 *	20 ng/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 4B1	样本稀释液 PT 4B1 (用于人血清、血浆、细胞上清以及细胞裂解液样本)	30 mL/瓶	2 瓶
Sample Diluent PT 3	样本稀释液 PT 3 (用于母乳样本)	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
Extraction Reagent	裂解液	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℃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°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 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。

6.5 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 $1 \times 10^7$ 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。

## 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。

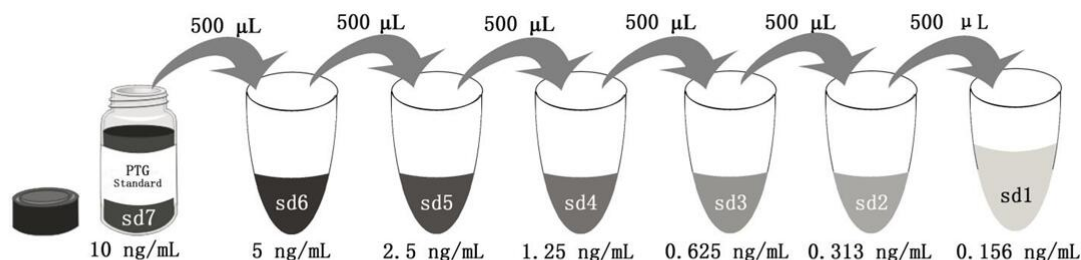
### 7.3 待检测样本：

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：人血清和血浆样本1:20或1:40稀释；细胞上清样本和母乳样本1:2稀释；细胞裂解液样本1:2到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：

检测人血清、血浆、细胞上清以及细胞裂解液样本，使用2 mL PT 4B1样本稀释液复溶标准品；检测母乳样本，使用2 mL PT 3样本稀释液复溶标准品，具体操作如下：



Add # $\mu\text{L}$ of Standard diluted in the previous step	—	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$
# $\mu\text{L}$ of Sample Diluent PT 4B1 or PT 3	2000 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$
	"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 (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  $\mu\text{L}$ ，余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本100  $\mu\text{L}$ /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 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 $\times$ ）洗涤板条，每孔350-400  $\mu\text{L}$ ，洗涤后，甩掉液体拍干板条，重复此步骤4次，避免异物进入板孔以及板条干燥；

8.5 每孔加100  $\mu\text{L}$  HRP标记检测抗体（1 $\times$ ）（参照试剂准备部分7.2），盖上封板膜，37°C孵育40 min；

8.6 重复步骤8.4；

8.7 显色：每孔加TMB显色液100  $\mu\text{L}$ ，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  $\mu\text{L}$ ，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）

8.9 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；

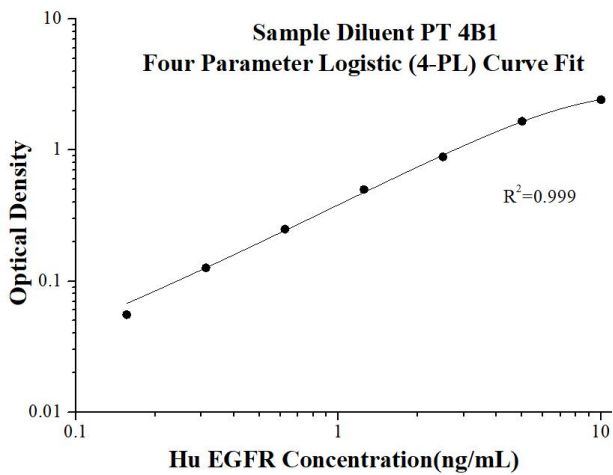
8.10 数据分析：每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

操作流程如下：

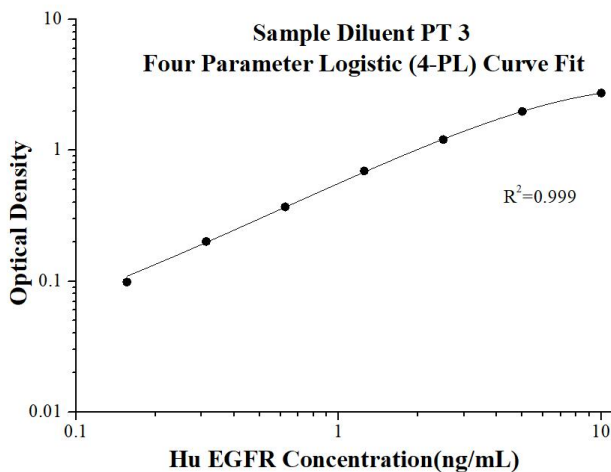
步骤	试剂	体积	孵育时间	洗涤次数	孵育温度
1	标准品或样本	100 $\mu$ L	120 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
2	HRP标记检测抗体 (1 $\times$ )	100 $\mu$ L	40 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
3	显色 TMB	100 $\mu$ L	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37°C孵育，避光
4	终止液	100 $\mu$ L	0 分钟	不需要洗涤	-
5	加入终止液后以630 nm为校正波长，在450 nm处测量OD值，此过程建议不超过5分钟				

## 九：实验参数

### 9.1 参考标曲图



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.027 0.030	0.029	-
0.156	0.082 0.086	0.084	0.055
0.313	0.155 0.155	0.155	0.126
0.625	0.275 0.280	0.277	0.249
1.25	0.531 0.527	0.529	0.500
2.5	0.929 0.905	0.917	0.888
5	1.667 1.705	1.686	1.657
10	2.464 2.443	2.454	2.425



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.043 0.040	0.042	-
0.156	0.142 0.138	0.140	0.098
0.313	0.242 0.243	0.243	0.201
0.625	0.406 0.417	0.411	0.370
1.25	0.723 0.750	0.736	0.695
2.5	1.222 1.279	1.250	1.208
5	2.010 2.044	2.027	1.985
10	2.748 2.816	2.782	2.740

## 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)					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	20	4.82	0.21	4.35	1	24	4.74	0.25	5.18
2	20	1.15	0.03	2.20	2	24	1.14	0.04	3.54
3	20	0.28	0.01	3.13	3	24	0.29	0.01	3.09

## 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EGFR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	1:80	84	79-89
	1:160	83	77-91
细胞上清	1:8	85	83-87
	1:16	83	76-90
细胞裂解液	1:320	85	71-94
	1:640	83	73-93
母乳	1:2	86	78-92
	1:4	94	85-102



## 9.4 样本值

应用本试剂盒，检测人血清、母乳样本中人EGFR的浓度：

样本类型	均值 (ng/mL)	范围 (ng/mL)
人血清 (n=16)	36.1	23.4-62.0
母乳 (n=7)	1.0	0.2-1.7

### 细胞上清

	EGFR (ng/mL)
HT-29	0.3
MDA-MD-231	1.1

### 细胞裂解液

	EGFR (ng/mL)	Total protein (mg/mL)
Hela	250.7	4.4
HepG2	2.6	4.1

## 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EGFR的灵敏度为0.029 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：

(人血清样本预先稀释10倍，细胞裂解液样本预先稀释160倍。)

		人血清 (样本稀释液 PT 4B1)	细胞上清 (样本稀释液 PT 4B1)	细胞裂解液 (样本稀释液 PT 4B1)	母乳 (样本稀释液 PT 3)
1:2	均值 (%)	100	100	100	100
	范围 (%)	-	-	-	-
1:4	均值 (%)	109	103	106	107
	范围 (%)	106-113	95-111	105-107	97-114
1:8	均值 (%)	119	104	112	111
	范围 (%)	118-120	96-117	111-113	100-118
1:16	均值 (%)	120	102	112	112
	范围 (%)	118-123	97-107	108-114	108-118

## 9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人EGFR，加入50 ng/mL以下细胞因子，无明显交叉反应

Human:

EGF

ErbB3

## 十：参考文献

1. Schlessinger J. et al. (2014). Cold Spring Harb Perspect Biol. 6(3).
2. Yoshida T. et al. (2010). Biochem Pharmacol. 80(5):613-23.
3. Wilson KJ. et al. (2012). Growth Factors. 30(2):107-16.
4. Sigismund S. et al. (2018). Mol Oncol. 12(1):3-20.