

## 人HER2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: KE00053  
规格: 96T  
灵敏度: 0.02 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、细胞上清以及尿液中人HER2浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

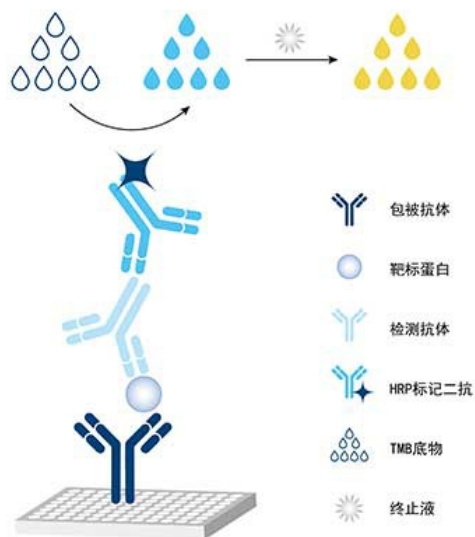
# 目录

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	8
9.6 线性	8
十：参考文献	9

## 一：背景信息

HER2也被称为ErbB2、Neu，是一个185kDa的跨膜糖蛋白，属于表皮生长因子受体（EGFR）家族成员之一，具有酪氨酸激酶活性。由于没有配体结合结构与，HER2蛋白主要通过与家族中其他成员包括EGFR（HER1/erbB1）、HER3/erbB3、HER4/erbB4形成异二聚体而与各自的配体结合。当与配体结合后，主要通过引起受体二聚化及胞浆内酪氨酸激酶区的自身磷酸化，激活酪氨酸激酶的活性。HER2蛋白介导的信号转导途径主要有Ras/Raf/MAPK通路，PI3K/Akt通路，STAT途径和PLC通路等。研究发现，在乳腺癌及卵巢癌等一些癌症中均发现HER2高表达。因此，HER2也是一个有潜力的癌症治疗靶点。

## 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 *	20 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 3-ac	样本稀释液 PT 3-ac (用于人血清、血浆样本)	30 mL/瓶	1 瓶
Sample Diluent PT 1-ec	样本稀释液 PT 1-ec (用于细胞上清、尿液样本)	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
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。
- 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℃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。

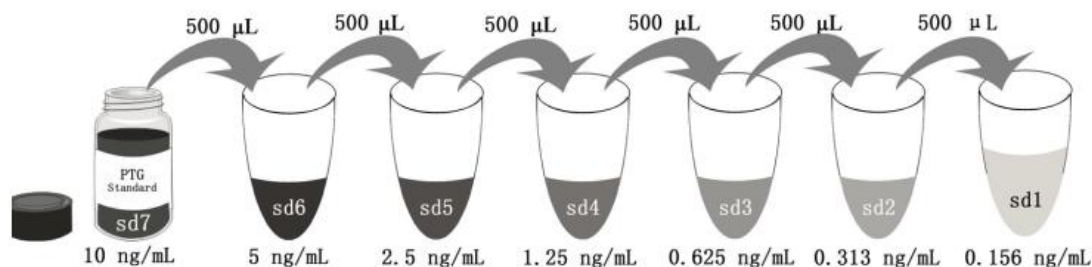
### 7.4 待检测样本：

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、血浆1:2或者1:4稀释; 细胞上清1:2或者1:4稀释; 尿液样本1:2或者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、血浆样本, 使用2 mL PT 3-ac 样本稀释液复溶标准品; 检测细胞上清以及尿液样本, 使用2 mL PT 1-ec 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-ac or PT 1-ec	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；

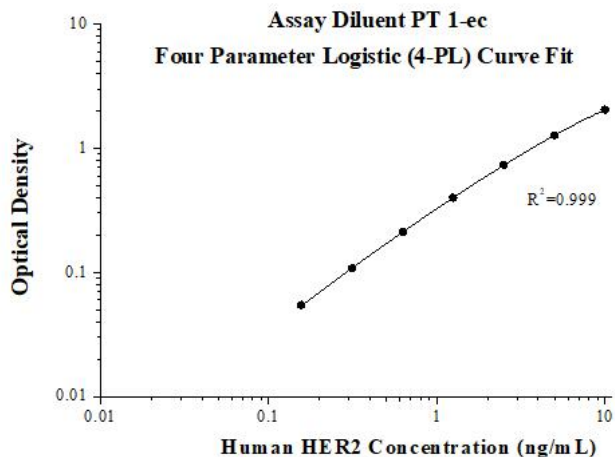
8.12 数据分析：每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

### 操作流程如下：

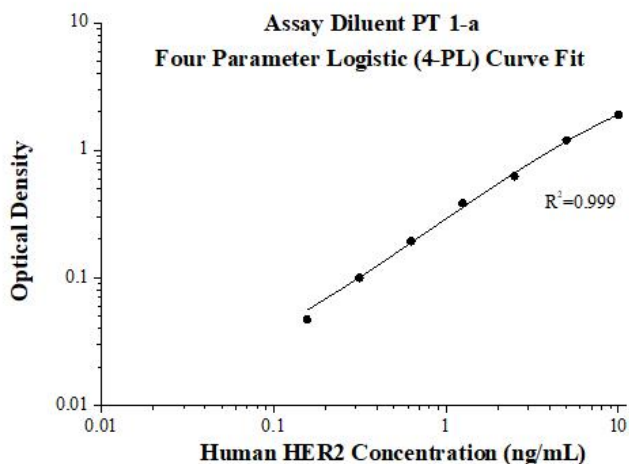
步骤	试剂	体积	孵育时间	洗涤次数	孵育温度
1	标准品或样本	100 μL	60 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
2	检测抗体 (1×)	100 μL	60 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
3	HRP标记二抗 (1×)	100 μL	40 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
4	显色 TMB	100 μL	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37°C孵育，避光
5	终止液	100 μL	0 分钟	不需要洗涤	-
6	加入终止液后以630 nm为校正波长，在450 nm处测量OD值，此过程建议不超过5分钟				

## 九：实验参数

### 9.1 参考标曲图



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.045 0.045	0.045	-
0.125	0.098 0.101	0.0995	0.0545
0.313	0.154 0.152	0.153	0.108
0.625	0.263 0.25	0.2565	0.2115
1.25	0.443 0.447	0.445	0.4
2.5	0.793 0.763	0.778	0.733
5	1.323 1.307	1.315	1.27
10	2.084 2.099	2.0915	2.0465



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.037 0.036	0.0365	-
0.156	0.083 0.084	0.0835	0.047
0.313	0.137 0.136	0.1365	0.1
0.625	0.229 0.232	0.2305	0.194
1.25	0.427 0.412	0.4195	0.383
2.5	0.668 0.655	0.6615	0.625
5	1.238 1.222	1.23	1.1935
10	1.912 1.958	1.935	1.8985

### 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	7.74	0.307	3.97
2	20	1.53	0.054	3.55
3	20	0.41	0.014	3.43

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	6.81	0.365	5.37
2	24	1.42	0.068	4.81
3	24	0.35	0.021	5.86

### 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HER2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 (%)
人血浆	1:2	99	91-105
	1:4	96	83-106
细胞上清	1:2	98	92-106
	1:4	100	93-108
尿液	1:2	101	91-121
	1:4	102	92-118

### 9.4 样本值

应用本试剂盒，检测28份健康人的血清样本中的HER2的浓度。

样本类型	检出率 (%)	均值 (ng/mL)	范围 (ng/mL)
人血清 (n=28)	37	1.43	0.12-9.12

### 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HER2的灵敏度为 0.02 ng/mL。

### 9.6 线性

人血浆、细胞上清、尿液加入高浓度的人HER2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		人血浆 (样本稀释液 PT3-ac)	细胞上清 (样本稀释液 PT1-ec)	尿液 (样本稀释液 PT1-ec)
1:2	均值 (%)	108	93	107
	范围 (%)	98-118	90-97	102-114
1:4	均值 (%)	101	99	102
	范围 (%)	99-103	96-102	96-114
1:8	均值 (%)	99	101	101
	范围 (%)	96-102	97-103	93-112
1:16	均值 (%)	102	101	104
	范围 (%)	98-106	98-107	91-119



## 十：参考文献

1. Hung MC, et al. Basic science of HER-2/neu: a review. *Semin Oncol.* 26(4 Suppl 12):51-9 (1999).
2. Slamon DJ, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med.* 344(11):783-92 (2001).
3. Pupa SM, et al. The extracellular domain of the c-erbB-2 oncoprotein is released from tumor cells by proteolytic cleavage. *Oncogene.* 8(11):2917-23 (1993).
4. Carney WP, et al. Potential clinical utility of serum HER-2/neu oncoprotein concentrations in patients with breast cancer. *Clin Chem.* 49(10):1579-98 (2003).
5. Colomer R, et al. Circulating HER2 extracellular domain and resistance to chemotherapy in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res.* 6(6):2356-62 (2000).