

人PG II 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: KE00090
规格: 96T
灵敏度: 0.03 ng/mL
检测范围: 1.56 - 100 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PG II 浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

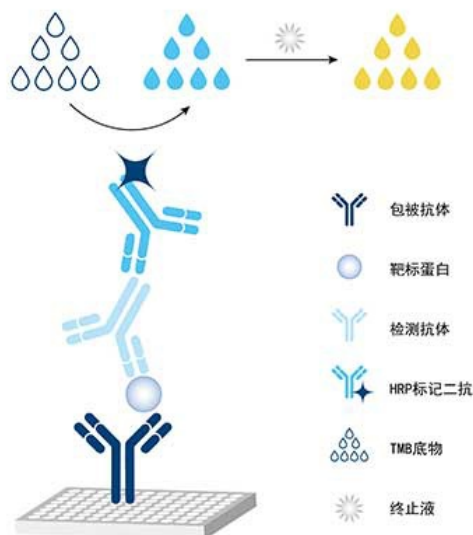
目录

| | |
|------------|---|
| 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

胃蛋白酶原 I 和 II 是胃蛋白酶的前体，由胃粘膜产生，释放到胃腔和外周循环。胃黏膜的晚期炎症及其在语体中向萎缩性胃炎 (AG) 的进展与血清生物标志物胃蛋白酶原 I 和 II 的变化有关 (PMID:23496362)。胃蛋白酶原 II 也被称为前胃液蛋白或PGC (胃蛋白酶原C)，是一种主要表达于胃主细胞的天冬氨酸蛋白酶，是一种新型的 II 型细胞标记物，与目前用于识别发育中的肺 II 型细胞的许多标记物相比具有优势 (PMID:14578117)。它参与蛋白质水解和肽解。

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 * | 100 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-ec | 样本稀释液 PT 3-ec (用于人血清和血浆样本) | 30 mL/瓶 | 1 瓶 |
| Sample Diluent PT 1-ef | 样本稀释液 PT 1-ef (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。

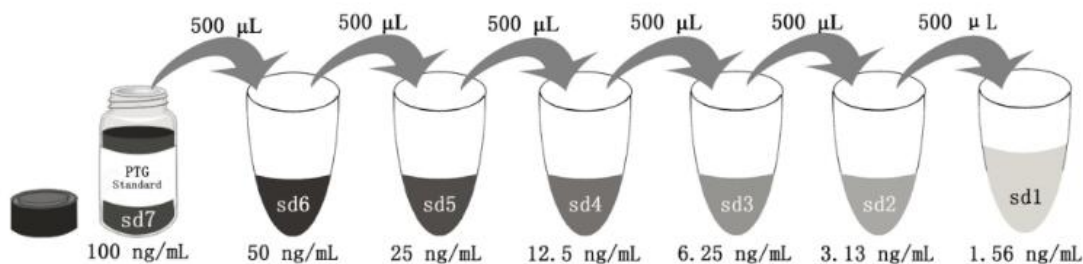
7.4 待检测样本：

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; 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1 mL PT 3-ec 样本稀释液复溶标准品。检测细胞上清样本, 使用1 mL PT 1-ef 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-ec or PT 1-ef | 1000 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×)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;

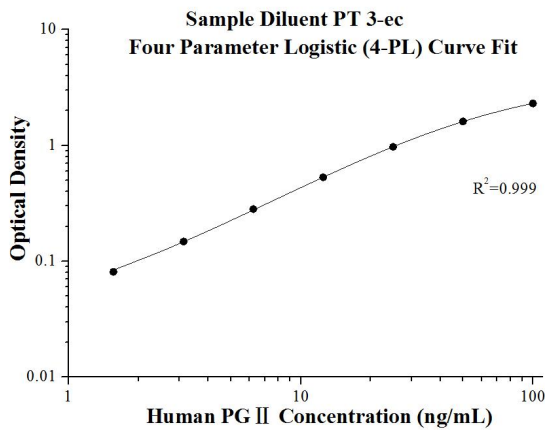
8.12 数据分析:每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值,设置复孔,取其平均值。以标准品的浓度为横坐标,OD值为纵坐标,使用专业软件(如Origin、ELISACalc等)进行四参数拟合(4-PL),根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度,乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

操作流程如下:

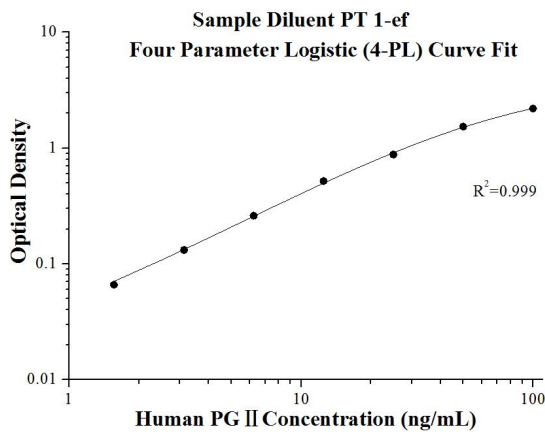
| 步骤 | 试剂 | 体积 | 孵育时间 | 洗涤次数 | 孵育温度 |
|----|--|--------|----------|-------|--------------|
| 1 | 标准品或样本 | 100 μL | 120 分钟 | 4 次 | 覆膜后37°C孵育 |
| 2 | 检测抗体(1×) | 100 μL | 60 分钟 | 4 次 | 覆膜后37°C孵育 |
| 3 | HRP标记二抗(1×) | 100 μL | 40 分钟 | 4 次 | 覆膜后37°C孵育 |
| 4 | 显色 TMB | 100 μL | 15-20 分钟 | 不需要洗涤 | 覆膜后37°C孵育,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 | 0.074 0.072 | 0.073 | - |
| 1.56 | 0.152 0.156 | 0.154 | 0.081 |
| 3.13 | 0.221 0.22 | 0.221 | 0.148 |
| 6.25 | 0.35 0.359 | 0.355 | 0.282 |
| 12.5 | 0.608 0.597 | 0.603 | 0.53 |
| 25 | 1.041 1.044 | 1.043 | 0.97 |
| 50 | 1.682 1.681 | 1.682 | 1.609 |
| 100 | 2.397 2.35 | 2.374 | 2.301 |



| (ng/mL) | O.D | Average | Corrected |
|---------|----------------|---------|-----------|
| 0 | 0.072 0.076 | 0.074 | - |
| 1.56 | 0.137 0.143 | 0.14 | 0.066 |
| 3.13 | 0.204 0.207 | 0.206 | 0.132 |
| 6.25 | 0.322 0.346 | 0.334 | 0.26 |
| 12.5 | 0.577 0.608 | 0.593 | 0.519 |
| 25 | 0.969 0.934 | 0.952 | 0.878 |
| 50 | 1.594 1.61 | 1.602 | 1.528 |
| 100 | 2.286 2.243 | 2.265 | 2.191 |

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 | 5.4 | 0.2 | 4.3 |
| 2 | 20 | 25.2 | 0.9 | 3.4 |
| 3 | 20 | 89.9 | 6.0 | 6.7 |

| 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 | 5.6 | 0.2 | 3.1 |
| 2 | 24 | 24.4 | 0.6 | 2.4 |
| 3 | 24 | 80.8 | 4.9 | 6.1 |

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PG II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 | 1:2 | 97 | 75-128 |
| | 1:4 | 100 | 77-128 |
| 细胞上清 | 1:2 | 88 | 88-89 |
| | 1:4 | 95 | 86-101 |

9.4 样本值

应用本试剂盒，检测健康人的血清样本中人PG II的浓度。

| 样本类型 | 均值 (ng/mL) | 范围 (ng/mL) |
|------------|------------|------------|
| 人血清 (n=16) | 8.5 | 4.5 - 11.8 |

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PG II的灵敏度为 0.03 ng/mL。

9.6 线性

人血浆和细胞上清样本加入高浓度的人PG II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 PT3-ec) | 细胞上清 (样本稀释液 PT1-ef) |
|------|--------|-----------------------|------------------------|
| 1:2 | 均值 (%) | 106 | 85 |
| | 范围 (%) | 79-118 | 85-89 |
| 1:4 | 均值 (%) | 101 | 91 |
| | 范围 (%) | 90-113 | 84-99 |
| 1:8 | 均值 (%) | 93 | 99 |
| | 范围 (%) | 83-100 | 92-106 |
| 1:16 | 均值 (%) | 100 | 105 |
| | 范围 (%) | 93-108 | 104-106 |

十：参考文献

1. Mohamadkhani A, et al. Are the serum biomarkers pepsinogen I and II good predictors for the detection of subjects with atrophic gastritis in areas that have different gastric cancer incidence. Arch Iran Med. 2013 Apr; 16(4):208-12.
2. Konishi N, et al. Tissue and serum pepsinogen I and II in gastric cancer identified using immunohistochemistry and rapid ELISA. J Clin Pathol. 1995 Apr; 48(4):364-7.
3. Hosseini M, et al. Serum gastrin 17, pepsinogen I and pepsinogen II in atrophic gastritis patients living in North-East of Iran. J Res Med Sci. 2013 Mar; 18(3):225-9.