

人ORM1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: KE00137
规格: 96T
灵敏度: 0.37 ng/mL
检测范围: 0.625 - 20 ng/mL
用途: 此试剂盒用于定量检测血清、血浆以及尿液中人ORM1浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

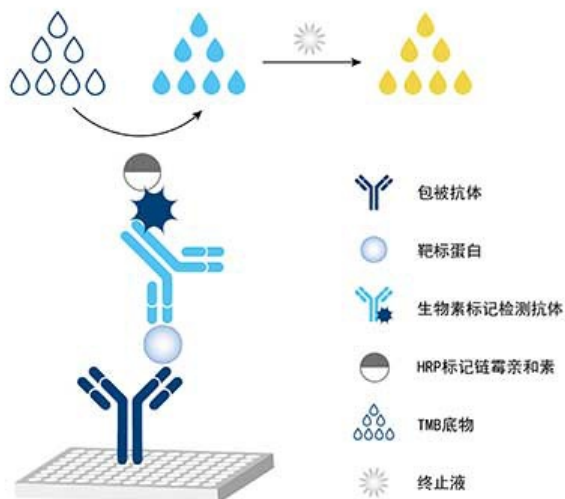
目录

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

ORM1 (Orosomuroid 1) , 也称为 AGP1 (Alpha-1-酸性糖蛋白 1) 和 AGP A, 是一种丰富的血浆蛋白, 具有抗炎和免疫调节特性。在人类中已经发现了两种同工型, 命名为 ORM1 和 ORM2。ORM1 涉及两个主要不同功能: (1) 作为脂质运载蛋白家族成员, 它发挥载体活性, 尤其是对药物和脂质分子; (2) 是一种急性期蛋白 (PMID: 23973664)。ORM1 在癌症、烧伤或外科手术患者中表达增加 (PMID: 10913518; PMID: 1646598)。ORM1 可能是一种潜在的新型尿液生物标志物, 用于早期检测慢性心力衰竭 (PMID: 25215505)。

二：检测原理



◀双抗夹心模式图 (检测抗体标记生物素)

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,biotinylated (100×)	生物素标记检测抗体浓缩液 (100×) **	120 μL/支	1 支
Streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) (100×)	HRP标记链霉亲和素浓缩液 (100×) **	120 μL/支	1 支
Sample Diluent PT 4-of	样本稀释液 PT 4-of (用于人血清、血浆样本)	30 mL/瓶	2 瓶
Sample Diluent PT 1	样本稀释液 PT 1 (用于尿液样本)	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
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 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标记链霉亲和素 (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标记的链霉亲和素浓缩液 (100×) 加 990 μL 抗体稀释液进行配制，轻轻混匀。

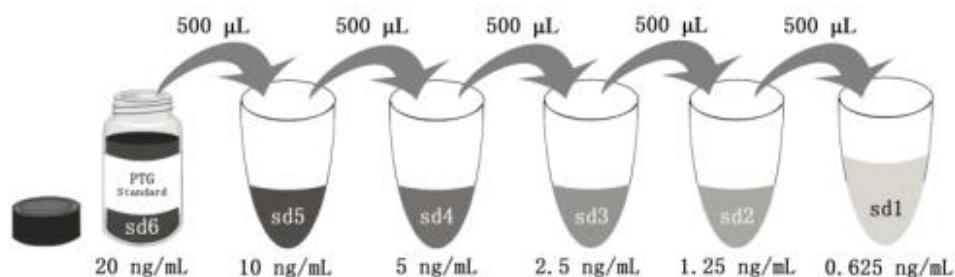
7.4 待检测样本：

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、血浆样本1:100000到1:800000稀释；尿液样本1:20到1:160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1 mL PT 4-of 样本稀释液复溶标准品。检测尿液样本，使用1 mL PT 1 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
# μL of Sample Diluent PT 4-of or PT 1	1000 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL
	"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标记链霉亲和素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标记链霉亲和素(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;

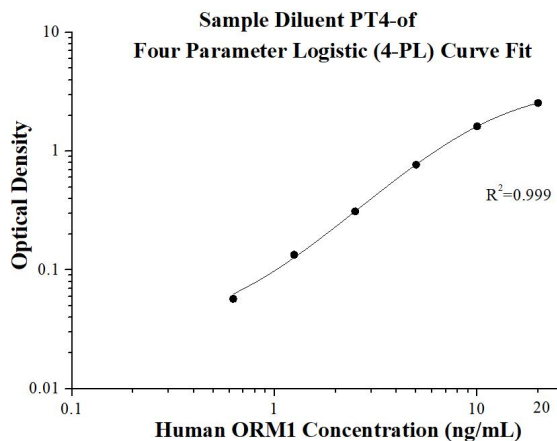
8.12 数据分析:每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值,设置复孔,取其平均值。以标准品的浓度为横坐标,OD 值为纵坐标,使用专业软件(如Origin、ELISACalc等)进行四参数拟合(4-PL),根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度,乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

操作流程如下:

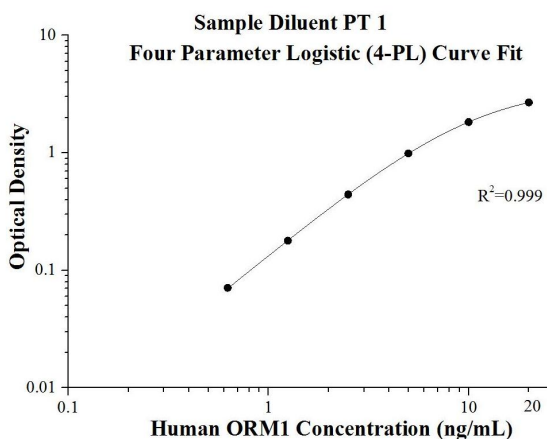
步骤	试剂	体积	孵育时间	洗涤次数	孵育温度
1	标准品或样本	100 μL	120 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
2	检测抗体(1×)	100 μL	60 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
3	HRP标记链霉亲和素(1×)	100 μL	40 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
4	显色 TMB	100 μL	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37°C孵育,避光
5	终止液	100 μL	0 分钟	不需要洗涤	-
6	加入终止液后以630 nm为校正波长,在450 nm处测量OD值,此过程建议不超过5分钟				

九：实验参数

9.1 参考标曲图



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.056 0.050	0.053	-
0.625	0.110 0.109	0.110	0.057
1.25	0.185 0.188	0.187	0.134
2.5	0.370 0.358	0.364	0.311
5	0.838 0.808	0.823	0.770
10	1.718 1.627	1.673	1.620
20	2.687 2.521	2.604	2.551



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.064 0.069	0.067	-
0.625	0.132 0.143	0.138	0.071
1.25	0.230 0.260	0.245	0.178
2.5	0.480 0.536	0.508	0.441
5	1.004 1.106	1.055	0.988
10	1.847 1.942	1.895	1.828
20	2.741 2.761	2.751	2.684

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	8.40	0.31	3.7
2	20	2.40	0.08	3.3
3	20	1.30	0.11	8.5

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	8.70	0.58	6.7
2	24	2.30	0.14	6.1
3	24	1.40	0.14	10.0

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ORM1的加标回收率实验，结果如下：

(血清样本预先稀释200000倍，尿液样本预先稀释40倍)

样本类型	稀释倍数	均值(%)	范围(%)
人血清	1:2	98	83-117
	1:4	93	78-108
尿液	1:2	86	77-94
	1:4	91	83-103

9.4 样本值

应用本试剂盒，检测健康人血清和尿液样本的人ORM1的浓度。

样本类型	均值 (µg/mL)	范围 (µg/mL)
人血清 (n=20)	619	262-1462

样本类型	均值 (ng/mL)	范围 (ng/mL)
尿液 (n=8)	793	126-2304

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ORM1的灵敏度为0.37 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 50000 倍，尿液样本预先稀释10倍)

稀释倍数		人血清 (样本稀释液PT 4-of)	尿液 (样本稀释液PT 3)
1:2	均值 (%)	100	100
	范围 (%)	-	-
1:4	均值 (%)	92	101
	范围 (%)	88-96	100-102
1:8	均值 (%)	88	107
	范围 (%)	86-89	105-108
1:16	均值 (%)	90	111
	范围 (%)	85-96	107-114

十：参考文献

1. Gemelli C et al., The Orosomuroid 1 protein is involved in the vitamin D - mediated macrophage de-activation process. *Exp Cell Res* 2013, 319: 3201-13.
2. Duché JC et al., Expression of the genetic variants of human alpha-1-acid glycoprotein in cancer. *Clinical Biochemistry* 2000, 33: 197-202.
3. Dijk W van et al., Inflammation-induced changes in expression and glycosylation of genetic variants of alpha 1-acid glycoprotein. Studies with human sera, primary cultures of human hepatocytes and transgenic mice. *Biochem J* 1991, 276: 343-7.
4. Hou LN et al., Excretion of urinary orosomuroid 1 protein is elevated in patients with chronic heart failure. *PLoS One* 2014, 9 (9): e107550.