

人Osteopontin/OPN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: KE00375

规格: 96T

灵敏度: 0.07 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、尿液、母乳以及细胞裂解液中的人Osteopontin/OPN浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

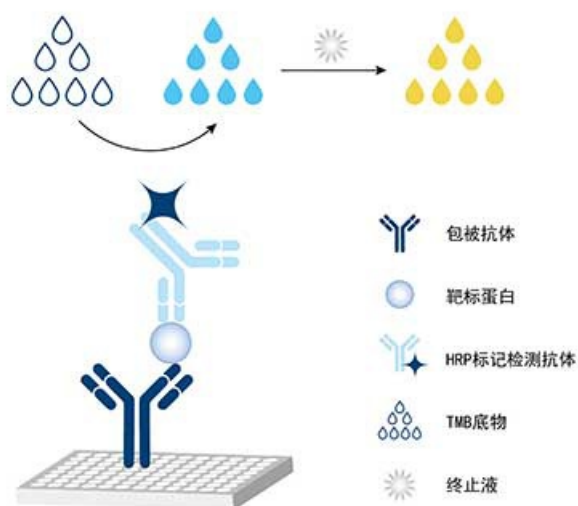
目录

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	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
9.7 特异性	9
十：参考文献	9

一：背景信息

骨桥蛋白(OPN), 也称为SPP1, 是一种分泌型糖磷蛋白, 属于小整合素结合配体N-连接糖蛋白(同胞)家族。最初从骨中分离出OPN, 现已在肾、血管组织、生物液体和各种肿瘤组织中发现。OPN可以与CD44和整合素相互作用, 并调节多种生物过程。它在骨发育和骨重建中具有多方面的作用, 并参与炎症和免疫反应、肿瘤发生和癌症进展。

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	30 mL/瓶	3 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		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。

6.5 母乳：收集样本后，在2-8℃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℃存放，避免反复冻融。

6.6 细胞裂解液：收集细胞后，用预冷(2-8℃)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℃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℃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。

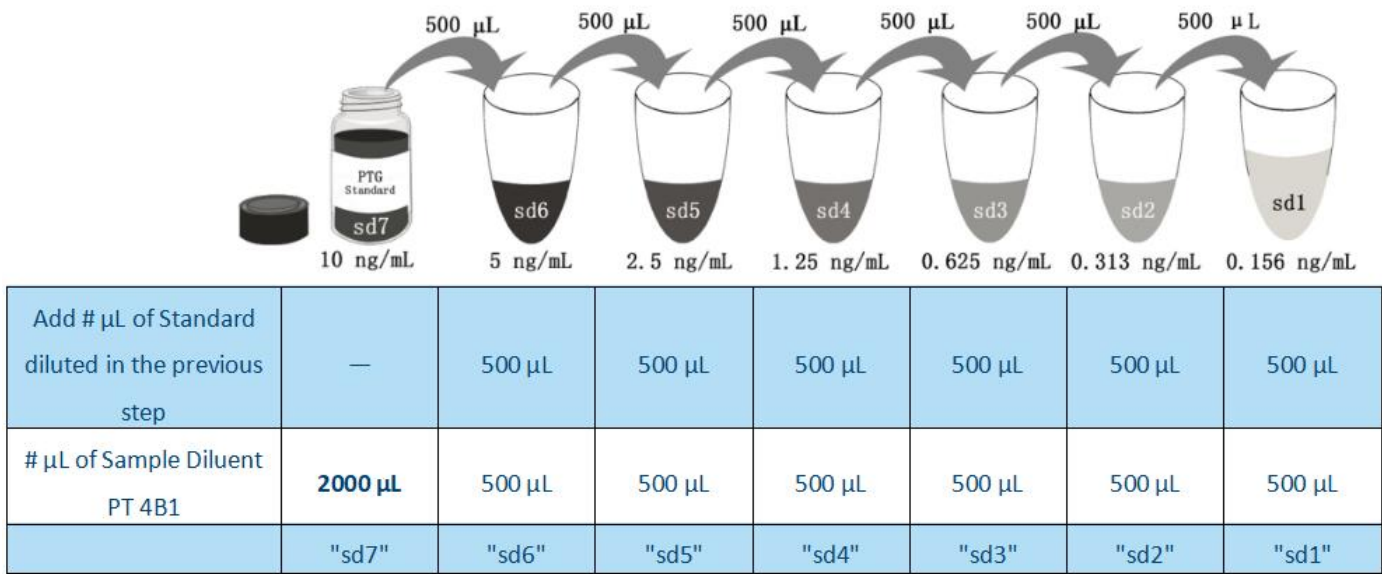
7.3 待检测样本：

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1:40或1:80稀释；细胞上清样本1:20或1:40稀释；尿液样本1:400或1:800稀释；母乳样本1:16000或1:32000稀释；细胞裂解液样本1:80000或1:160000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：

使用2 mL PT 4B1 样本稀释液复溶标准品，具体操作如下：



八：实验步骤

实验前，需要将所需试剂在室温平衡20-30min（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。

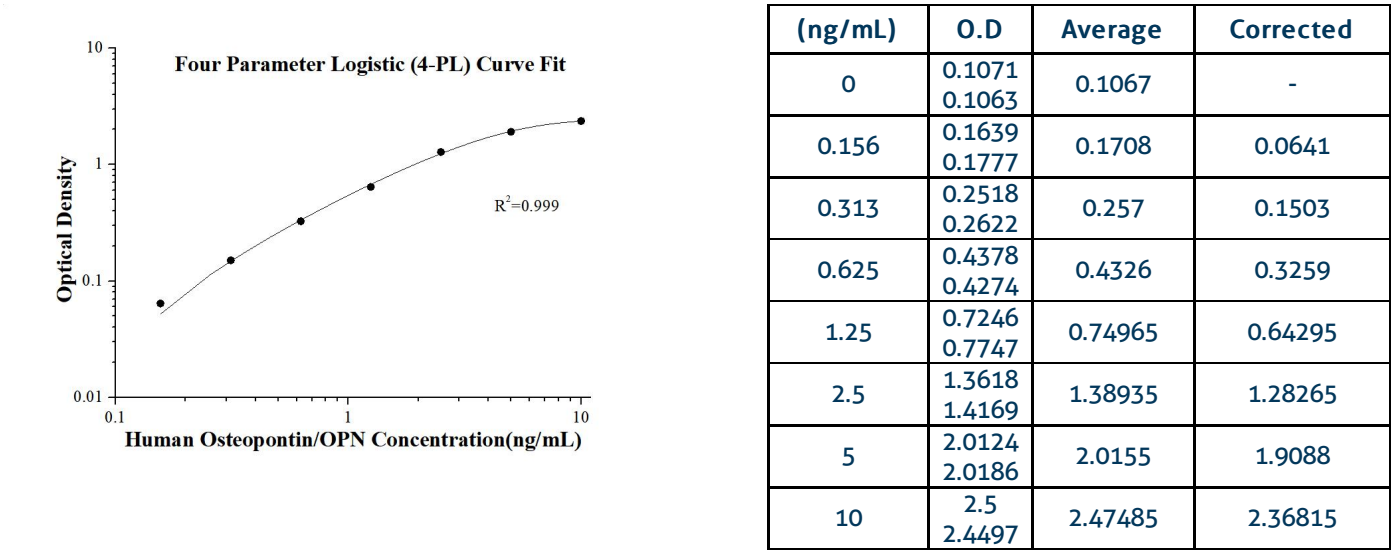
- 8.1 根据实验用量，取出需要用到的酶标板条，剩余板条加入干燥剂放入铝箔袋密封后存放于4℃，并于一周之内用完；
- 8.2 加样，分别设零孔、标准孔、待测样本孔。零孔加样本稀释液100 µL，余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本100 µL/孔，注意不要产生气泡（建议标准品和样本都做复孔，尽量避免实验误差，确保上样不间断，5-10 min完成加样）；
- 8.3 酶标板盖上覆膜，37℃孵育2 h；
- 8.4 洗涤
 - 1) 揭开封板膜（动作轻柔，避免动作过大导致液体溢出串孔），弃液体，拍干；
 - 2) 洗涤液（1×）洗涤板条，每孔350-400 µL，洗涤后，甩掉液体拍干板条，重复此步骤4次，避免异物进入板孔以及板条干燥；
- 8.5 每孔加100 µL HRP标记检测抗体（1×）（参照试剂准备部分7.2），盖上封板膜，37℃孵育40 min；
- 8.6 重复步骤8.4；
- 8.7 显色：每孔加TMB显色液100 µL，37℃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 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）
- 8.9 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 μL	120 分钟	4 次	覆膜后37℃孵育
2	HRP标记检测抗体（1×）	100 μL	40 分钟	4 次	覆膜后37℃孵育
3	显色 TMB	100 μL	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37℃孵育，避光
4	终止液	100 μL	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



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	10.58	0.93	8.76	1	24	9.99	0.97	9.66
2	20	2.46	0.10	4.20	2	24	2.26	0.13	5.65
3	20	0.57	0.02	3.25	3	24	0.54	0.04	7.14

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Osteopontin/OPN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	1:160	83	79-88
	1:320	86	82-89
细胞上清	1:40	82	75-94
	1:80	84	76-98
尿液	1:800	108	87-123
	1:1600	110	96-122
母乳	1:16000	114	105-119
	1:32000	111	103-121
细胞裂解液	1:320000	92	72-114
	1:640000	100	87-110

9.4 样本值

人血浆/尿液/母乳 - 应用本试剂盒，检测人血浆、尿液以及母乳样本中人Osteopontin/OPN的浓度。

样本类型	平均值 (ng/mL)	范围 (ng/mL)
人血浆 (n=15)	89.44	8.88-560.91
尿液 (n=8)	1426.23	135.49-5219.95
母乳 (n=8)	16810.48	12527.41-22337.04

细胞上清 - 人肝癌细胞HepG2在含有10%胎牛血清、2.5 mM L-谷氨酰胺、100 U/mL青霉素和100 µg/mL硫酸链霉素的DMEM中培养。收集细胞上清，检测人Osteopontin/OPN的浓度为198.34 ng/mL。

细胞裂解液

	人Osteopontin/OPN (ng/mL)	总蛋白 (mg/mL)
HL-60 细胞裂解液	84145.7	4.3

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Osteopontin/OPN的灵敏度为0.07 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：
(人血浆样本预先稀释20倍，细胞上清样本预先稀释10倍。尿液样本预先稀释200倍。母乳样本预先稀释8000倍。细胞裂解液样本预先稀释40000倍。)

		人血浆	细胞上清	尿液	母乳	细胞裂解液
1:2	均值 (%)	100	100	100	100	100
	范围 (%)	-	-	-	-	-
1:4	均值 (%)	104	98	104	107	103
	范围 (%)	104-105	95-102	99-110	96-117	102-103
1:8	均值 (%)	102	96	98	97	109
	范围 (%)	92-109	87-108	94-105	86-108	102-116
1:16	均值 (%)	115	85	99	91	112
	范围 (%)	110-121	81-89	88-113	82-100	104-121

9.7 特异性

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

Human:
MMP-3
MMP-7
Mouse:
OPN

十：参考文献

1. Rittling SR, Chambers AF. Br J Cancer. (2004) 17;90(10):1877-81.
2. Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. Trends Cell Biol. (2006) 16(2):79-87.
3. Icer MA, Gezmen-Karadag M. Clin Biochem. (2018) 59:17-24.
4. Jia Q, Ouyang Y, et al. Lung. (2024) 202(1):25-39.
5. Tang Z, Xia Z, et al. Cytokine Growth Factor Rev. (2023) 74:86-99.