

人PDGFR beta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: KE00331

规格: 96T

灵敏度: 0.01 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、血浆以及组织裂解液中的人PDGFR beta浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

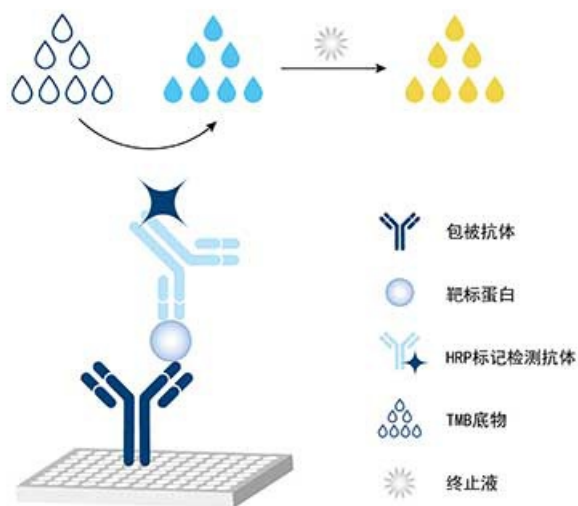
目录

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
十：参考文献	9

一：背景信息

PDGFR beta (血小板衍生生长因子受体 β) 是一种典型的跨膜酪氨酸激酶受体，当血小板衍生生长因子 (PDGF) 激活时，可促进血管形成，并控制生长、增殖、运动和生存等许多重要的细胞过程。血小板衍生生长因子受体 β 在神经元、血管平滑肌细胞和周细胞中均有表达。通过免疫组化表达，血小板衍生生长因子受体 β 可能作为胃癌的预后因子。此外，通过刺激EZH2介导的Ink4a/Arf抑制，血小板衍生生长因子受体 β 的激活足以促进心肌细胞增殖和心脏再生。

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	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
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 组织裂解液：

- 1) 使用预冷的1×PBS清洗组织，吸干水分后，用剪刀剪碎，加入适量的裂解液（加PMSF至裂解液中，终浓度为1 mM，每100 mg组织加入1 mL裂解液，不同样本需自行优化）；
- 2) 转移到预冷玻璃匀浆器中，匀浆约20-30下。匀浆效果与细胞类型和组织类型相关，不同细胞或组织所需的匀浆次数有所不同，需自行优化；
- 3) 匀浆20-30次后取约2-3 μL细胞或组织匀浆液滴在盖玻片上并在显微镜下观察，如见细胞核周晕环或完整的细胞形态，说明细胞仍完整。如果有70-80%的细胞均无核周晕环和完整细胞形态，说明细胞已经充分破碎，则进行下一步实验。否则，重新匀浆10-30次直到细胞至少90%已经破碎；
- 4) 细胞破碎后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。

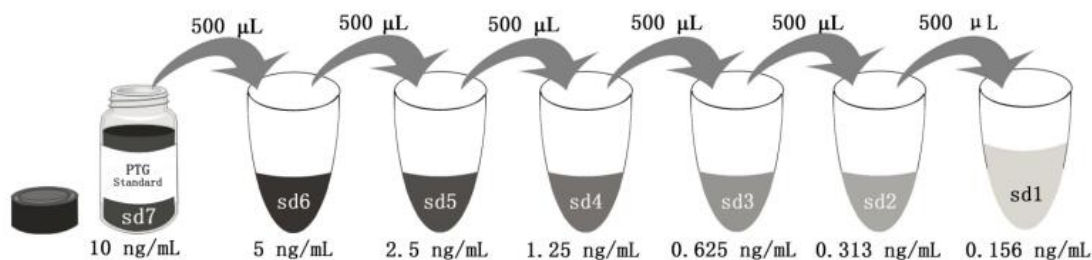
7.3 待检测样本：

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1:4或1:8稀释；组织裂解液样本1:8或1:16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：

用2 mL PT 4B1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 4B1	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20-30min（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°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 \times ）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 \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 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）；

8.8 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；

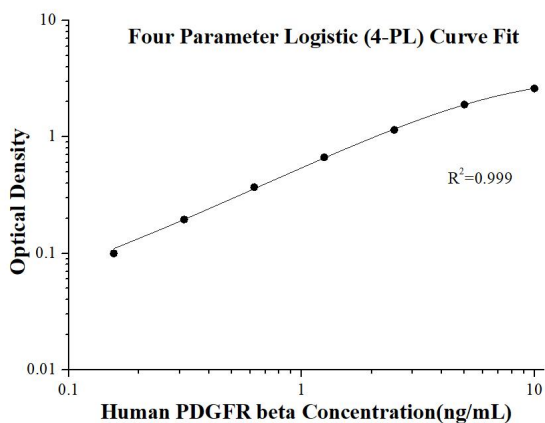
8.10 数据分析：每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD值为纵坐标，使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

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 μ L	120 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
2	HRP标记检测抗体 (1 \times)	100 μ L	40 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
3	显色 TMB	100 μ L	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37°C孵育，避光
4	终止液	100 μ 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	0.037 0.0412	0.0391	-
0.156	0.1408 0.137	0.1389	0.0998
0.313	0.2358 0.2324	0.2341	0.195
0.625	0.4064 0.4103	0.40835	0.36925
1.25	0.6967 0.7184	0.70755	0.66845
2.5	1.1857 1.1909	1.1883	1.1492
5	1.9241 1.9441	1.9341	1.895
10	2.6418 2.6474	2.6446	2.6055

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	3.74	0.14	3.86
2	20	0.92	0.04	4.42
3	20	0.22	0.02	8.93

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	3.64	0.17	4.69
2	24	0.89	0.03	3.56
3	24	0.23	0.01	5.56

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PDGFR beta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	1:16	106	98-121
	1:32	116	96-129
组织裂解液	1:16	86	73-113
	1:32	99	84-125

9.4 样本值

人血浆-应用本试剂盒，检测人血浆样本中人PDGFR beta的浓度。

样本类型	均值 (ng/mL)	范围 (ng/mL)
人血浆样本 (n=16)	14.88	3.56-27.35

组织裂解液

样本类型	人PDGFR beta (ng/mL)	总蛋白 (mg/mL)
人胎盘组织裂解液	25.43	1.50

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PDGFR beta的灵敏度为0.01 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2倍，组织裂解液样本预先稀释4倍。)

		人血浆	组织裂解液
1:2	均值 (%)	100	100
	范围 (%)	-	-
1:4	均值 (%)	105	92
	范围 (%)	98-112	90-95
1:8	均值 (%)	111	82
	范围 (%)	99-124	78-85
1:16	均值 (%)	112	83
	范围 (%)	102-119	72-92

十：参考文献

1. Baohong Liu. et al. (2022). Cancer Biomark. 34(2):251-264.
2. Stine Westergaard Mathorne. et al. (2019). BMC Neurol. 19(1):60.
3. Thangarajan Rajkumar. et al. (2017). Cytokine. 89:82-90.
4. Zhang Yue. et al. (2019). Cell Rep. 28(4):966-978.