

## 人 SFRP1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: KE00266  
规格: 96T  
灵敏度: 0.009 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和血浆中人SFRP1浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

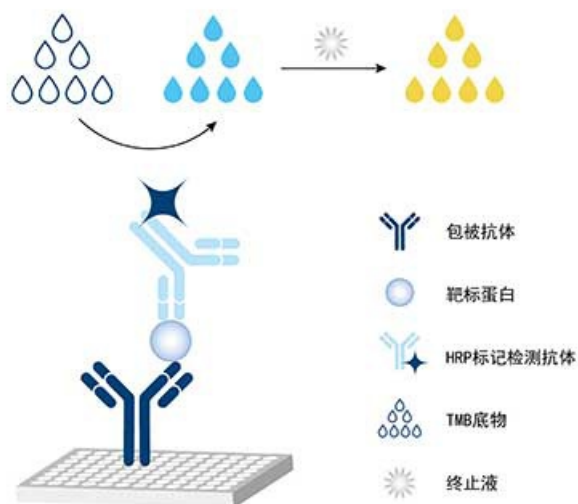
## 目录

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	7
9.4 样本值	8
9.5 灵敏度	8
9.6 线性	8
9.7 特异性	8
十：参考文献	9

## 一：背景信息

分泌卷曲相关蛋白1 (Secreted Frizzled Related Protein 1, SFRP1)属于SFRP家族，该家族含有一个富含半胱氨酸的结构域，该结构域与卷曲蛋白的Wnt-结合位点同源。SFRP1由于在各种人类癌症中表达缺失而被归类为肿瘤抑制基因，其主要原因是通过DNA甲基化或microRNAs的转录沉默导致表观遗传失活。SFRP1是人类胃癌侵袭性亚群的生物标志物，并且在肝细胞癌中SFRP1表达缺失与预后不良相关。肿瘤组织中SFRP1高表达的患者总体生存率明显更高，SFRP1可作为生存期较差患者的预后生物标志物。

## 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 *	10 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 3	样本稀释液 PT 3	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
<b>储存条件：</b> 1：未开启试剂盒可在2-8°C条件下存放6个月或者在-20°C条件下存放1年 2：已开启试剂盒可在2-8°C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°C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°C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)。

## 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 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。

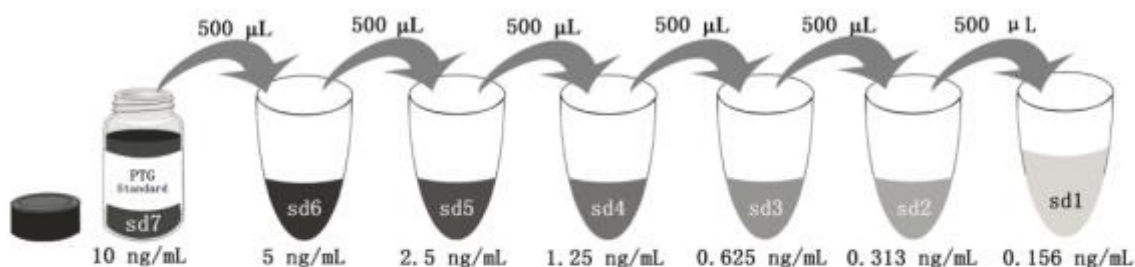
### 7.3 待检测样本：

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1:2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。

### 7.4 梯度稀释的标准品：

使用1 mL PT 3 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	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(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、标准品孔、待测样本孔。零孔加样本稀释液100  $\mu$ L,余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本100  $\mu$ L/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  $\mu$ L,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  $\mu$ L 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  $\mu$ L,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  $\mu$ L,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;

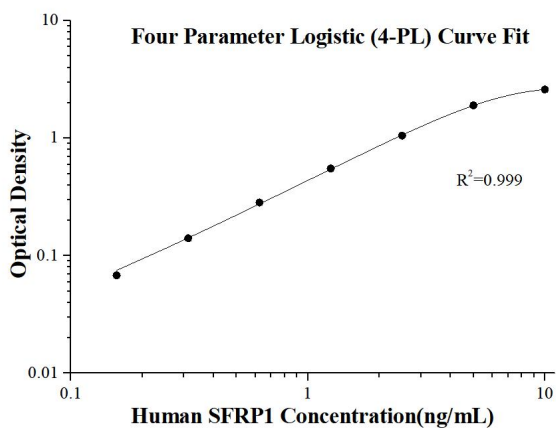
8.10 数据分析:每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值,设置复孔,取其平均值。以标准品的浓度为横坐标,OD 值为纵坐标,使用专业软件(如Origin、ELISACalc等)进行四参数拟合(4-PL),根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度,乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

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 $\mu$ L	120 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
2	HRP标记检测抗体 (1 $\times$ )	100 $\mu$ L	40 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
3	显色 TMB	100 $\mu$ L	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37°C孵育,避光
4	终止液	100 $\mu$ 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	0.098 0.092	0.095	-
0.156	0.159 0.166	0.163	0.068
0.313	0.236 0.235	0.236	0.141
0.625	0.379 0.378	0.379	0.284
1.25	0.656 0.64	0.648	0.553
2.5	1.175 1.12	1.148	1.053
5	2.001 1.996	1.999	1.904
10	2.718 2.672	2.695	2.600

### 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	6.8	0.3	5.2
2	20	1.5	0.1	5.8
3	20	0.7	0.03	4.9

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	7.6	0.3	4.5
2	24	1.7	0.2	9.2
3	24	0.7	0.1	9.5

### 9.3 加标回收率

人血浆样本稀释后，在标曲范围内选择高、中、低3个浓度，进行人SFRP1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	102	94-111
	1:4	112	100-123

## 9.4 样本值

应用本试剂盒，检测健康人血清样本中人SFRP1的浓度。

样本类型	均值 (ng/mL)	检出率 (%)	范围 (ng/mL)
人血清 (n=16)	1.2	62.5	ND*-3.7

ND\*=Non-detectable

## 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SFRP1的灵敏度为0.009 ng/mL。

## 9.6 线性

用对应样本稀释液稀释人血清样本，使稀释后的检测值处于标曲范围内，线性数据如下：

稀释倍数		人血清
1:2	均值 (%)	100
	范围 (%)	-
1:4	均值 (%)	108
	范围 (%)	99-121
1:8	均值 (%)	105
	范围 (%)	98-118
1:16	均值 (%)	123
	范围 (%)	123-123

## 9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人SFRP1



## 十：参考文献

1. Wang Z, et al. (2020). *Cancer Cell Int.* 18: 48
2. Cheng LC, et al. (2020) *Sci Rep.* 10(1): 13255
3. Baharudin R, et al. (2020) *Cancers (Basel).* 12(2): 445
4. Qu Y, et al. (2013) *Eur J Cancer.* 49(17): 3718-3728
5. Davaadorj M, et al. (2016) *Anticancer Res.* 36(2): 659-664