

人APOE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: SE50006
- 规格: 96T
- 灵敏度: 0.03 ng/mL
- 检测范围: 0.156 - 10 ng/mL (用于尿液和母乳)
0.313 - 20 ng/mL (用于血清、血浆和细胞上清)
- 用途: 此试剂盒用于定量检测血清、血浆、细胞上清、尿液以及母乳中的人APOE浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

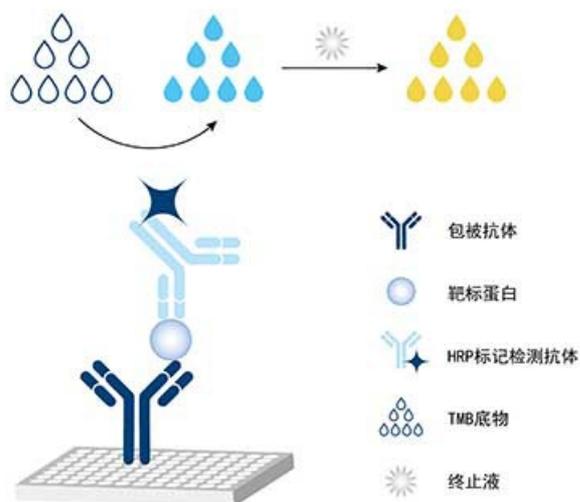
目录

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	7
九：实验参数	8
9.1 参考标曲图	8
9.2 精密度	8
9.3 加标回收率	9
9.4 样本值	9
9.5 灵敏度	9
9.6 线性	10
十：参考文献	10

一：背景信息

载脂蛋白 E (APOE) 是一种与脂质代谢有关的血浆蛋白。它主要由肝细胞、巨噬细胞和神经细胞产生。在中枢神经系统中，APOE 是主要的细胞外脂质载体，在损伤后的神经元保护和修复中起关键作用。APOE存在基因多态性，具有三个等位基因：APOE2 (cys112、cys158)、APOE3(cys112、arg158) 和 APOE4 (arg112、arg158)。APOE2 对阿尔茨海默氏症 (AD) 和心脏病具有保护作用，而APOE4是动脉粥样硬化和AD的风险因子。高血浆APOE水平与心血管死亡率密切相关。

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;
- 3.8 微孔板恒温振荡器。

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 *	40 ng/瓶	2 瓶
Detection antibody, HRP-conjugated (100×)	HRP标记检测抗体浓缩液 (100×) **	60 μL/支	1 支
Sample Diluent PT 1	样本稀释液 PT 1 (用于人血清、血浆和细胞上清样本)	30 mL/瓶	2 瓶
Sample Diluent PT 4B1	样本稀释液 PT 4B1 (用于尿液和母乳样本)	30 mL/瓶	1 瓶
Detection Diluent	抗体稀释液	15 mL/瓶	1 瓶
Wash Buffer Concentrate (20×)	浓缩洗涤液 (20×)	30 mL/瓶	1 瓶
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°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)。
- 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°C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°C存放，避免反复冻融。
- 6.5 母乳：收集样本后，在2-8°C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°C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 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 (50 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。

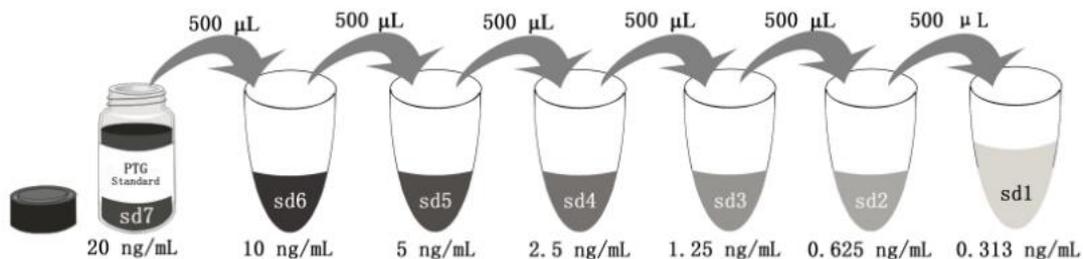
7.3 待检测样本：

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1:16000或1:32000稀释；细胞上清样本1:80或1:160稀释；尿液样本1:2或1:4稀释；母乳样本1:80或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。

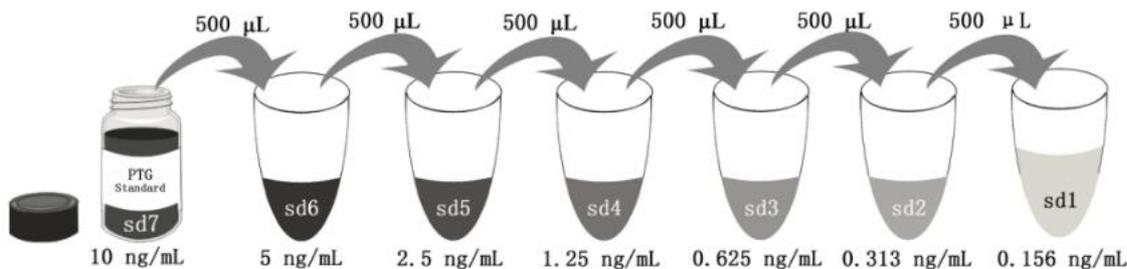
7.4 梯度稀释的标准品：

检测人血清、血浆和细胞上清样本，用2 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					
# μL of Sample Diluent PT 1	2000 μL	500 μL					
	"sd7"	"sd6"	"sd5"	"sd4"	"sd3"	"sd2"	"sd1"

检测尿液和母乳样本，用4 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					
# μL of Sample Diluent PT 4B1	4000 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50 μL，余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本50 μL/孔；加检测抗体，每孔加50 μL HRP标记检测抗体(1×)(参照试剂准备部分7.2)。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，置于微孔板恒温振荡器上，37°C 500±50 rpm孵育1 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 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)；

8.6 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）

8.7 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；

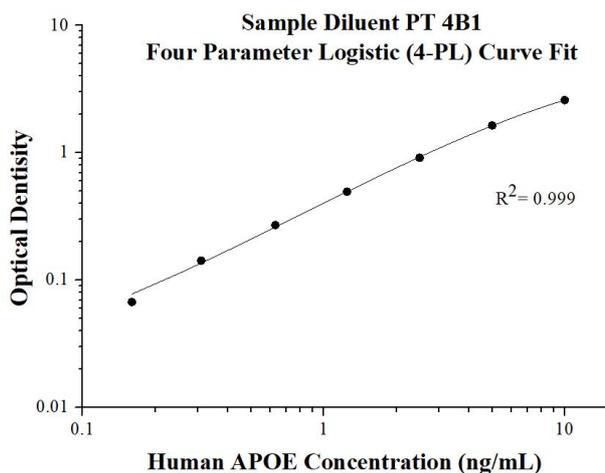
8.8 数据分析: 每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值, 设置复孔, 取其平均值。以标准品的浓度为横坐标, OD 值为纵坐标, 使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度, 乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

操作流程如下：

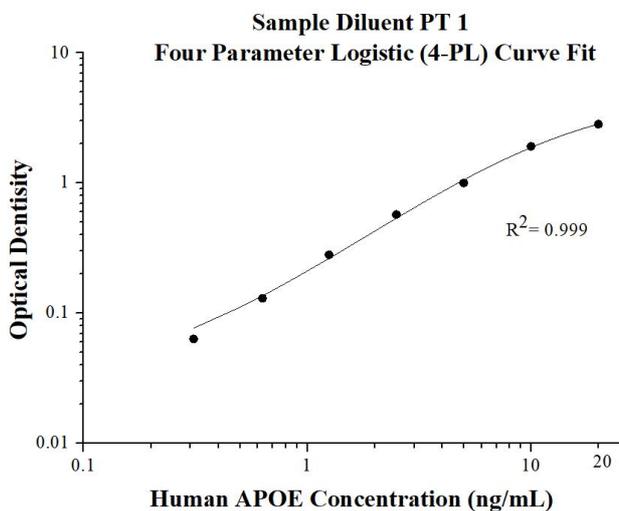
步骤	试剂	体积	孵育时间	洗涤次数	孵育温度
1	标准品或样本, 检测抗体 (1×)	各50 μL	60 分钟	4 次	覆膜后37°C, 500±50 rpm孵育
2	显色 TMB	100 μL	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37°C孵育, 避光
3	终止液	100 μL	0 分钟	不需要洗涤	-
4	加入终止液后以630 nm为校正波长, 在450 nm处测量OD值, 此过程建议不超过5分钟				

九：实验参数

9.1 参考标曲图



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.0125 0.013	0.0128	0
0.156	0.0847 0.0757	0.0802	0.0675
0.313	0.1546 0.1561	0.1554	0.1426
0.625	0.2827 0.2846	0.2837	0.2709
1.25	0.5223 0.4962	0.5093	0.4965
2.5	0.9306 0.9266	0.9286	0.9159
5	1.6834 1.6255	1.6545	1.6417
10	2.6561 2.5616	2.6089	2.5961



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.0122 0.0113	0.0118	0
0.313	0.0691 0.0812	0.0752	0.0634
0.625	0.1424 0.1412	0.1418	0.1301
1.25	0.2978 0.2878	0.2829	0.2811
2.5	0.5991 0.5693	0.5842	0.5725
5	0.9638 1.0615	1.0127	1.0009
10	1.9757 1.8658	1.9208	1.9090
20	2.9354 2.7596	2.8475	2.8358

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	9.66	0.18	1.88
2	20	1.73	0.04	2.38
3	20	0.41	0.02	3.97

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	9.38	0.19	2.08
2	24	1.76	0.04	2.15
3	24	0.46	0.01	2.15

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APOE的加标回收率实验，结果如下：

样本类型	稀释倍数	均值(%)	范围(%)
人血清	1:64000	103	82-119
	1:128000	102	82-126
细胞上清	1:160	106	90-115
	1:320	104	81-126
尿液	1:8	99	80-113
	1:16	95	81-110
母乳	1:320	108	97-121
	1:640	100	89-121

9.4 样本值

人血清 - 应用本试剂盒，检测人血清样本中人APOE的浓度。

样本类型	均值 (mg/mL)	范围 (mg/mL)
人血清样本 (n=16)	72.68	17.06-118.38

细胞上清 - 在含有10%的胎牛血清、2 mM L-谷氨酰胺、100 U/ml青霉素和100 µg/ml硫酸链霉素的DMEM培养基中培养人肝癌细胞HepG2，收集细胞上清，检测人APOE的浓度为40.30 ng/mL。

尿液/母乳 - 应用本试剂盒，检测尿液以及母乳样本中人APOE的浓度。

样本类型	均值 (ng/mL)	范围 (ng/mL)
尿液样本 (n=7)	6.56	2.35-20.75
母乳 (n=7)	76.11	44.74-137.34

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APOE的灵敏度为0.03 ng/mL。

9.6 线性

用相应的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8000倍，细胞上清样本预先稀释20倍，母乳样本预先稀释40倍。)

		人血清 (样本稀释液 PT 1)	细胞上清 (样本稀释液 PT 1)	尿液 (样本稀释液 PT 4B1)	母乳 (样本稀释液 PT 4B1)
1:2	均值(%)	100	100	100	100
	范围 (%)	-	-	-	-
1:4	均值(%)	92	92	113	103
	范围 (%)	86-99	83-100	106-121	95-115
1:8	均值(%)	93	88	117	103
	范围 (%)	83-99	82-95	106-124	96-116
1:16	均值(%)	101	88	105	93
	范围 (%)	85-119	79-100	83-116	93-97

十：参考文献

1. Teng E. et al. (2015). Dement Geriatr Cogn Disord. 39(3-4):154-66.
2. Mooijaart SP. et al. (2006). PLoS Med. Jun;3(6):e176.