



# 人脊椎蛋白 2 (SPON2)

## ELISA KIT

### 使用说明书

**指标名称:** 人脊椎蛋白2 (SPON2) 酶联免疫试剂盒

**英文名称:** Human SPON2 (SPON2) ELISA KIT

**规格:** 96T/48T

**保质期:** 6 个月 (具体请见试剂盒外包装标签)

**用途:** 试剂盒用于体外定量检测血清、血浆或其他相关生物液体中人脊椎蛋白2 (SPON2) 的浓度。

**灵敏度:** 10 pg/ml 。

**特异性:** 检测样本中的人脊椎蛋白2 (SPON2) , 与其类似物无明显交叉反应。

**重复性:** 板内, 板间变异系数均 < 10%。

**检测范围:** 62.5 pg/ml – 2000 pg/ml。

试剂盒仅供科研使用, 不得用于临床诊断!



## 检测原理:

本试剂盒采用双抗体夹心法。用抗人脊椎蛋白2 (SPON2) 抗体包被于酶 标板上, 实验时样品或标准品中的人脊椎蛋白2 (SPON2) 会与包被抗体结合, 再加入辣根过氧化物酶标记的抗体, 形成抗体-抗原-酶标抗体复合物, 反应洗 板后, 游离的成分被洗去。加入显色底物(TMB), TMB在辣根过氧化物酶的催化 下呈现蓝色, 加终止液后变成黄色。颜色的深浅和样品中的人脊椎蛋白2 (SPON2) 呈正相关。用酶标仪在450nm 波长下测定吸光度 (OD 值) , 计算样品浓度。

## 实验所需自备试验器材:

1. 酶标仪 (450nm)
2. 高精度加样器及枪头: 0.5-10uL、2-20uL、20-200uL、200-1000uL
3. 37°C恒温箱
4. 蒸馏水或去离子水

## 试剂盒组成:

试剂盒仅供科研使用, 不得用于临床诊断!



| 名称       | 96 孔配置    | 48 孔配置    | 备注        |
|----------|-----------|-----------|-----------|
| 微孔酶标板    | 12 孔×8 条  | 12 孔×4 条  | 可拆卸       |
| 标准品      | 0.3mL*6 管 | 0.3mL*6 管 | 无         |
| 样本稀释液    | 6mL       | 3mL       | 公共组份      |
| 检测抗体-HRP | 10mL      | 5mL       | 无         |
| 20×洗涤缓冲液 | 25mL      | 15mL      | 公共组份      |
| 底物 A     | 6mL       | 3mL       | 公共组份      |
| 底物 B     | 6mL       | 3mL       | 公共组份      |
| 终止液      | 6mL       | 3mL       | 公共组份      |
| 封板膜      | 2 张       | 2 张       | 可裁剪使用     |
| 说明书      | 1 份       | 1 份       | 无         |
| 自封袋      | 1 个       | 1 个       | 临时保存未用完板条 |

### 说明:

- 1、标准品浓度从高到低依次为: 2000、 1000、 500、 250、 125、 62.5 pg/ml。
- 2、所有试剂瓶盖须旋紧以防止蒸发和微生物的污染, 试剂体积以实际发货为准。 相关试剂在分装时会比标签上标明的体积稍多一些, 请在使用时量取, 而非直接倒出。

### 检测前准备工作:

试剂盒仅供科研使用, 不得用于临床诊断!



1. 请提前 60 分钟从冰箱中取出试剂盒和样本，平衡至室温。
2. 从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶，属于正常现象；放置室温，轻摇均匀，待结晶完全溶解后再配置洗涤液。可将 20ml 浓缩洗涤液用蒸馏水或去离子水稀释配置成 400ml 工作浓度的洗涤液，未用完的放回 4℃。
3. 20×洗涤缓冲液的稀释：蒸馏水按 1: 20 稀释，即 1 份 20×洗涤缓冲液加 19 份蒸馏水。

### 样品收集方法:

样品种类繁多，建议使用参考论文中的样本处理方法，以下罗列常规几种 样品制备方法，仅供参考。

1. **血清**：全血样品于室温放置 2 小时或 4℃过夜后于 2000rpm 转速离心 20 分钟，取上清即可检测，收集血液的试管应为一次性的无内毒素试管。
2. **血浆**：抗凝剂推荐使用 EDTA 钠盐，样品采集后30 分钟内于 2000rpm 转 速离心 15 分钟，取上清即可检测。  
避免使用溶血，高血脂样品。

试剂盒仅供科研使用，不得用于临床诊断！



3. **组织匀浆:** 用预冷的 PBS(0.01M, pH=7.4)冲洗组织, 去除残留血液, 称重后将组织剪碎。将剪碎的组织与对应体积的PBS(一般按 1: 9 的重量体积比, 比如 1g 的组织样品对应9mL 的 PBS, 具体体积可根据实验需要适当调整, 并做好记录。推荐在 PBS 中加入蛋白酶抑制剂)加入玻璃匀浆器中, 在冰上充分研磨。为了进一步裂解组织细胞, 可以对匀浆液进行超声破碎或反复冻融。最后将匀浆液 5000rpm 转速离心 5-10 分钟, 取上清检测。
4. **细胞提取液:** 贴壁细胞用冷的 PBS 轻轻清洗, 然后用胰蛋白酶消化, 2000rpm 转速离心 5 分钟后收集细胞; 悬浮细胞可直接离心收集。收集的细胞用冷的 PBS 洗涤 3 次。每  $1 \times 10^6$  个细胞中加入 150-200  $\mu$ L PBS 重悬, 反复冻融使细胞破碎(若含量很低可减少 PBS 的体积)。将提取液于 2000rpm 转速离心 10 分钟, 取上清检测。
5. **细胞培养上清或其他生物体液:** 2000rpm 转速离心 20 分钟, 除去杂质及细胞碎片。取上清检测。

试剂盒仅供科研使用, 不得用于临床诊断!



## 样品注意事项:

1. 样品收集后若在 1 周内进行检测的可保存于4℃，若不能及时检测，请 按一次使用量分装，冻存于-20℃以下，避免反复冻融。标本溶血会影响最后检 测结果，因此溶血标本不宜进行此项检测。
2. **试剂盒检测范围不等同于样本的浓度范围，如果您的样品中检测物浓度 高于标准品最高值，请根据实际情况，做适当倍数稀释(建议先做预实验拉梯度，以确定稀释倍数)**  
。
3. 若使用化学裂解液制备组织匀浆或细胞提取液，由于引入某些化学物质 会导致 ELISA 测值出现偏差。
4. 某些重组蛋白可能与试剂盒中捕获或检测抗体不匹配而出 现不能检测 的情况。

## 操作步骤:

试剂盒仅供科研使用，不得用于临床诊断！



1. 计算并确定一次实验所需的预包被板条数，取出所需板条放置在 96 孔 框架内，剩余微孔板放回铝箔袋密封，保存于 4°C。
2. 试剂盒和样本在室温下(25-28°C)平衡60min，充分平衡到室温（注意： 试剂盒和样本的平衡，非常重要，一定要平衡到足够时间）。
3. 设置标准品孔、样本孔和空白孔。
4. 标准品孔各加不同浓度的标准品50μL；
5. 样本孔中加入待测样本50μL（根据实际情况可适当稀释）；
6. 空白孔加入样本稀释液50μL；
7. 所有孔中，每孔加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的检测抗体100μL， 用封板膜封住反应孔，37°C水浴锅或恒温箱温育45min。
8. 弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液（350μL），静置 20s，甩 去洗涤液，吸水纸上拍干，如此重复洗板5次（也可用洗板机洗板）。
9. 每孔加入底物 A、B 各 50μL，37°C避光孵育 15min。
10. 每孔加入终止液 50μL，15min 内，在 450nm 波长处测定

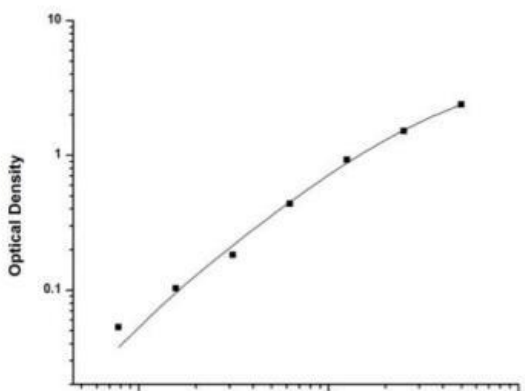
试剂盒仅供科研使用，不得用于临床诊断！



各孔的 OD 值。

## 实验结果计算:

各标准品及样本如设复孔, 则应取其平均值计算。以标准品的浓度为横坐标, OD值为纵坐标, 绘出标准曲线(最佳方程式应依回归方程计算的 $R^2$ 值来定, 以 $R^2$ 值越趋近于1为好)。通过样品的吸光度值和标准曲线(直线拟合或者4参数拟合)计算出样品的相应浓度(工作人员可提供计算软件)。再乘以相应稀释倍数(没有稀释不需要乘), 即为样品实际浓度。



(示意图)

## 典型数据:

试剂盒仅供科研使用, 不得用于临床诊断!



以下数据仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线。

| 浓度<br>(pg/ml) | 62.5   | 125    | 250    | 500    | 1000   | 2000   |
|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| OD            | 0.1107 | 0.1427 | 0.2599 | 0.5227 | 0.8468 | 1.7638 |

### 精密度:

板内精密度:低浓度样本,中浓度样本和高浓度样本分别在 1 块板子上检测 20 次。

板间精密度:低浓度样本,中浓度样本和高浓度样本分别在 3 块板子上检测 20 次。

|                | 批内变异系数 |       |      | 批间变异系数 |     |      |
|----------------|--------|-------|------|--------|-----|------|
| 样本             | 1      | 2     | 3    | 1      | 2   | 3    |
| 数量             | 20     | 20    | 20   | 20     | 20  | 20   |
| 平均值<br>(pg/ml) | 120    | 222.5 | 1130 | 130    | 265 | 1100 |

试剂盒仅供科研使用，不得用于临床诊断！



|                 |      |       |       |      |       |        |
|-----------------|------|-------|-------|------|-------|--------|
| <b>标准差</b>      | 8.41 | 14.02 | 62.49 | 8.63 | 26.98 | 111.65 |
| <b>变异系数 (%)</b> | 7.01 | 6.3   | 5.53  | 6.64 | 10.18 | 10.15  |

## 回收率:

分别往不同样本中添加已知浓度的 SPON2, 做回收实验, 得出回收率范围和平均回收率。

| <b>样本类型</b>   | <b>回收率范围 (%)</b> | <b>平均回收率 (%)</b> |
|---------------|------------------|------------------|
| 血清(n=5)       | 89-107           | 99               |
| 血浆(EDTA)(n=5) | 90-112           | 99               |
| 细胞培养基(n=5)    | 86-110           | 99               |

## 线性:

将添加有 SPON2 的样本分别稀释 2 倍, 4 倍, 8 倍, 16 倍做回收实验, 得出回收率范围及平均回收率。

| <b>稀释<br/>倍数</b> |  | <b>血清<br/>(n=5)</b> | <b>血浆(EDTA)<br/>(n=5)</b> | <b>细胞培养基<br/>(n=5)</b> |
|------------------|--|---------------------|---------------------------|------------------------|
|------------------|--|---------------------|---------------------------|------------------------|

试剂盒仅供科研使用, 不得用于临床诊断!



|      |          |        |        |        |
|------|----------|--------|--------|--------|
| 1:2  | 回收率范围(%) | 92-106 | 89-107 | 86-110 |
|      | 平均回收率(%) | 97     | 95     | 97     |
| 1:4  | 回收率范围(%) | 86-100 | 88-104 | 87-107 |
|      | 平均回收率(%) | 96     | 97     | 97     |
| 1:8  | 回收率范围(%) | 90-102 | 92-104 | 87-105 |
|      | 平均回收率(%) | 99     | 96     | 99     |
| 1:16 | 回收率范围(%) | 91-113 | 90-110 | 90-106 |
|      | 平均回收率(%) | 100    | 97     | 98     |

## 警告

本试剂盒中使用了稀硫酸作为终止液，其具有轻微腐蚀性，使用时应避免接触衣物或眼、手等皮肤暴露部位。

## 友情提醒

试剂盒仅供科研使用，不得用于临床诊断！



试剂盒使用完毕后，请妥善处理相关耗材，避免环境污染！

## 说明

1. 限于现有条件及科学技术水平，尚不能对所有原料进行全面的鉴定分析，本产品可能存在一定的质量技术风险。
2. 本试剂盒在研发过程中去除/降低了生物学样本中的一些内源性干扰因素，并非所有可能影响的因素均已去除。
3. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及当时的实验环境等因素密切相关，本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，请使用者使用前充分考虑到样本可能的使用量，预留充足的样本。
4. 为了达到好的实验结果，请只使用本公司试剂盒内提供的试剂，不要混用其他制造商的产品，严格按照说明书操作。
5. 在储存及温育过程中避免将试剂暴露在强光中。所有试剂瓶盖须盖紧以防止蒸发和微生物污染，因为蛋白水解

试剂盒仅供科研使用，不得用于临床诊断！



酶的干扰将导致测值不准确。

6. 刚开启的酶联板板孔中可能会有少许水样物质，此为正常现象，不会对实验结果造成任何影响。酶标板在使用时从包装袋里取出，请勿提前取出。
7. 由于操作过程中试剂制备以及酶标仪参数设置不正确，可能导致结果异常，实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器。
8. 即使是相同人员操作也可能在两次独立实验中得到不同的结果，为保证结果的重现性，需要控制实验过程中每一步的操作。
9. 试剂盒发货前会经过严格的质检，然而，因为运输条件、实验设备差异等等因素影响，用户检测结果可能跟出厂数据不一致。不同批次间试剂盒间的差异也可能来自上述原因。
10. 本试剂盒未与其他厂家同类试剂盒或不同方法检测同一目的物的产品进行对比，所以不排除检测结果不一致的情况。
11. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他

试剂盒仅供科研使用，不得用于临床诊断！



用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。

试剂盒仅供科研使用，不得用于临床诊断！