

人血管生成素酶联免疫吸附测定试剂盒

Human Angiogenin ELISA Kit

本产品冰袋运输: 保存于 4℃ (其中 **标准品** 需保存于 -20℃), 保质期 6 个月; **标准品** 如存放于 4℃, 1~2 周内有效。

货号规格

HJ003 96次

产品特点

- 高灵敏度**——多次重复结果表明, 最小检出量为 4.75 pg/mL;
- 高特异性**——与人 EGF、GM-CSF、MIP-1 α 、MIP-1 β 、TGF- α 、TGF- β 1 及小鼠 EGF、GM-CSF、MIP-1 α 均无交叉反应;
- 重复性好**——板内, 板间变异系数均小于 10%。

产品简介

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法检测样品中人血管生成素的浓度。人血管生成素捕获抗体已经预包被于酶标板上, 当加入样品或标准品时, 其中的人血管生成素会与捕获抗体结合, 而其它游离成分则会通过洗涤被除去。接着, 再加入生物素化的抗人血管生成素抗体后, 抗人血管生成素抗体与人血管生成素接合, 形成夹心的免疫复合物, 其它游离成分则通过洗涤被除去。随后加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的亲合素, 生物素与亲合素特异性结合, 这样亲合素上标记的 HRP 就与夹心的免疫复合物连接起来, 而其它游离成分则通过洗涤被除去。最后加入显色剂, 若样品中存在人血管生成素, 则会形成免疫复合物, 其上连接的 HRP 会催化无色的显色剂氧化生成蓝色物质, 而后加入终止液, 最终产物呈黄色。通过酶标仪检测, 读其 450 nm 处的 OD 值, 人血管生成素浓度与 OD450 值之间呈正比, 通过检测标准品绘制标准曲线, 对照未知样品中 OD 值, 即可计算出样品中人血管生成素的浓度。

背景简介

人血管生成素是一种非糖基化的多肽, 由 123 个氨基酸残基组成, 分子量为 14 kDa, 含有三个链内二硫键, 属于核糖核酸酶家族。

血管生成素一般由血管内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞、结肠柱状上皮细胞、淋巴细胞、腺癌干细胞以及肿瘤细胞系等产生, 其通常以分泌蛋白形式进入血液中, 其含量高达 60~120 ng/mL。

血管生成素作为核糖核酸酶与其它的核糖核酸酶家族成员一样, 具有细胞毒性, 其机理主要是抑制细胞中蛋白质的合成。血管生成素也可以通过磷脂酶的活化, 刺激毛细血管和脐静脉内皮细胞生成甘油二酯以及前列腺素的分泌。

产品内容

| 组分 | 体积或数量 |
|----------------------|----------------|
| 人血管生成素预包被板 | 12条 |
| 标准品稀释液 (5 \times) | 20 mL |
| 人血管生成素标准品 | \geq 2支 (冻干) |
| 人血管生成素生物素化抗体 | 10 mL |
| HRP 标记的亲合素 | 10 mL |
| 浓缩洗涤液 (20 \times) | 30 mL |
| 显色剂 TMB | 10 mL |
| 终止液 | 5 mL |
| 封板胶纸 | 3张 |

操作步骤

◆ 样品制备

1. 根据样品种类选择相应的处理方法:
 - A. 细胞上清: 将细胞培养上清液 $100\sim 500\times g$ 离心 5 min, 去除悬浮物后即可;
 - B. 血清样品: 将全血在室温下静置 0.5~2h, 待其自然凝固并析出血清后, 离心取黄色上清即可 (4°C , $1,000\sim 2,000\times g$, 10 min), 注意请勿吸取沉淀, 制备好的血清需置于冰上待用, 请勿在其中添加任何防腐剂或抗凝剂;
 - C. 血浆样品: 使用 EDTA 对全血进行抗凝处理后, 混合均匀置于冰上, 离心取黄色上清即可 (4°C , $1,000\sim 2,000\times g$, 10 min), 注意请勿吸取沉淀, 制备好的血浆需置于冰上待用;

注意: ① 人血清或血浆样品需稀释后再进行检测;

② 若待测样品无法及时检测, 样品制备完成后, 请分装冻存于 -20°C , 避免反复冻融;

③ 请保证待测样品清澈透明, 检测前如发现样品中有悬浮物, 需通过离心去除;

④ 为了保证检测结果准确, 请勿使用溶血、黄疸、高血脂或污染的样品。

◆ 检测准备工作

2. 试剂盒自冰箱取出后, 请置于室温平衡 20 min; 检测完成后, 剩余试剂请及时置于 4°C 保存;
3. 将 **浓缩洗涤液 (20 \times)** 用双蒸水或去离子水稀释为 1 \times 洗涤液;
4. 将 **标准品稀释液 (5 \times)** 用双蒸水或去离子水稀释为 1 \times 标准品稀释液;
5. 按标准品标签上注明的复溶体积, 用 1 \times 标准品稀释液复溶使标准品终浓度达到 500 pg/mL, 室温操作, **请严格控制在 $25\sim 28^{\circ}\text{C}$** , 静置 15~20 min 后轻轻混悬, 用移液器吹打数次, 使其彻底溶解, 然后按下表用 1 \times 标准品稀释液倍比梯度稀释后依次加入检测孔中。(最高浓度为 500 pg/mL, 将 1 \times 标准品稀释液作为浓度 0 pg/mL。)

| 管号 | 稀释液用量 (μL) | 复溶后标准品用量 (μL) | 标准品的最终浓度 (pg/mL) |
|----|-------------------------|----------------------------|------------------|
| A | 0 | 250 | 500 |
| B | 250 | 250 | 250 |
| C | 250 | 250 (从 B 管中取) | 125 |
| D | 250 | 250 (从 C 管中取) | 62.5 |
| E | 250 | 250 (从 D 管中取) | 31.25 |
| F | 250 | 250 (从 E 管中取) | 15.625 |
| G | 250 | 0 | 0 |

注意: 标准品复溶加样后, 剩余部分请丢弃。

◆ 检测流程

6. 通过计算确定一次实验所需的板条数, 取出所需板条放置于框架内, 多余的板条请放回铝箔袋密封, 保存于 4°C ;

注意: ① 标准品和样品建议做双复孔检测;

② 建议设置本底校正孔, 即空白孔, 只加入相应体积的 **显色剂 TMB** 和 **终止液** 即可;

③ 每次实验均需绘制标准曲线。

7. 将样品和不同浓度标准品 (100 μL /孔) 分别加入相应孔中, 用封板胶纸封住反应孔, 室温孵育 120 min。细胞上清样品一般可直接进行检测, 如超过试剂盒的检测范围, 可用 1 \times 标准品稀释液进行相应稀释; 对于血清或血浆样品, 需稀释 100 到 8,000 倍, 如无明确范围, 建议用 1 \times 标准品稀释液从

100 倍开始稀释；

注意：① 请查阅相关文献确定样品中待检测蛋白的大致浓度，若其大于或小于本试剂盒的最高或最低标准品浓度，请将样品适当稀释或浓缩后再进行检测；

② 整个加样过程不宜超过 10min，否则可能会影响检测结果。

8. 洗板 5 次，每孔 1×洗涤液用量为 300μL，注入与吸出间隔 15~30s，洗完后将板倒扣在厚吸水纸上拍干；

注意：洗涤过程至关重要，洗涤不充分会导致结果产生较大误差。

9. 加入 **人血管生成素生物素化抗体**(100μL/孔，无需稀释)。用封板胶纸封住反应孔，室温孵育 60 min；

注意：检测血清和血浆样品时，检测抗体的孵育时间应适当延长。

10. 洗板 5 次，方法同步骤 8；

11. 加入 **HRP 标记的亲合素**(100μL/孔，无需稀释)。用封板胶纸封住反应孔，避光室温孵育 20 min；

12. 洗板 5 次，方法同步骤 8；

13. 加入 **显色剂 TMB**(100μL/孔)，避光室温孵育 10~20 min；

注意：在保存和使用时，请勿将 TMB 接触氧化剂和金属。

14. 加入 **终止液**(50μL/孔)，混匀后即刻使用酶标仪测量 OD450，同时设定 540 nm 或 570 nm 作为校正波长，即可计算得到校正吸光度值(OD450-OD540 或 OD450-OD570)；

注意：读取 OD 值建议在 10 min 内完成。

◆ 数据分析

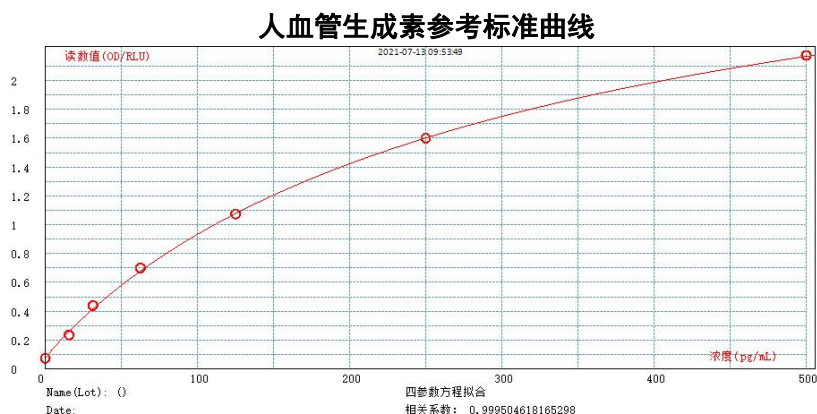
15. 绘制标准曲线。以标准品浓度作横坐标，OD 值作纵坐标，利用计算机软件作四参数逻辑(4-PL)曲线拟合创建标准曲线，通过样品的 OD 值即可在标准曲线上计算出其相应浓度。

注意：① 复孔 OD 值在 20% 的差异范围内结果才有效，复孔 OD 值取平均后可作为测量值；

② 每个标准品或样品的 OD 值应减去本底校正孔的 OD 值；

③ 若样品 OD 值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测，计算浓度时应乘以稀释倍数。

◆ 标准曲线范例



注意：本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线计算样品含量。

注意事项

1. **浓缩洗涤液** 低温情况下可能会出现结晶，请水浴加热使结晶完全溶解后再配制工作液；
2. 严禁混用不同批号试剂盒的组分；
3. 加样过程请避免产生气泡，实验操作过程中一定要保证试剂充分混匀，否则会使结果产生较大误差；
4. 说明书中提到的室温条件，请严格控制在 25~28℃；
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；
6. 本产品仅限科研使用。

版本号：21C24