

# 人促血管生成素 1 酶联免疫吸附测定试剂盒

## Human Angiopoietin-1 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

HJ004 96次

### 产品特点

- 高灵敏度**——多次重复结果表明, 最小检出量为 126 pg/mL;
- 高特异性**——与人 Angiopoietin-2 及 Angiopoietin-4 均无交叉反应, 与小鼠 Angiopoietin-3 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 法检测样品中人促血管生成素 1 (Angiopoietin-1) 的浓度。人 Angiopoietin-1 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 Angiopoietin-1 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 Angiopoietin-1 抗体后, 抗人 Angiopoietin-1 抗体与人 Angiopoietin-1 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 Angiopoietin-1, 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 450nm 处的 OD 值, 人 Angiopoietin-1 浓度与 OD450 值之间呈正比, 通过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 Angiopoietin-1 浓度。

### 背景简介

促血管生成素 1 (Angiopoietin-1 或 Ang-1) 隶属于促血管生成素家族, 这个家族的蛋白主要包括促血管生成素 1、促血管生成素 2、促血管生成素 3 和促血管生成素 4。人促血管生成素 1 是一个由 498 个氨基酸构成的分泌糖蛋白, 其最显著的结构特征是: 用于介导多聚体形成的 N 末端双卷曲结构域, 以及用于与受体结合的 C 端的纤维蛋白酶结构域。

促血管生成素 1 在成人组织中广泛存在, 特别在血管内皮的支持细胞如巨核细胞及血小板等表达较多, 其主要功能是作为血管生成、重构及成熟的正相调节蛋白。促血管生成素 1 与促血管生成素 2 均可与受体酪氨酸激酶 Tie-2 结合, 促血管生成素 1 与 Tie-2 结合从而激活下游 PI3K、FAK 等蛋白, 进而调节产生纤溶酶和 MMP-2 等。Ang-1/Tie-2 通路能维持造血干细胞在骨髓中处于静息状态, 延迟分化。促血管生成素 1 和促血管生成素 2 水平的变化可以提示肿瘤血管的生成, 研究表明, 循环的促血管生成素 1 水平的升高与高血压及肿瘤生成有关。

### 产品内容

组分	体积或数量
人 Angiopoietin-1 预包被板	12 条
样品分析缓冲液	5 mL
标准品稀释液 (5×)	10 mL
人 Angiopoietin-1 标准品	≥2 支 (冻干)
人 Angiopoietin-1 生物素化抗体	10 mL
HRP 标记的亲合素	10 mL
浓缩洗涤液 (20×)	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 ( $4^{\circ}\text{C}$ ,  $1,000\sim 2,000\times g$ , 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 ( $4^{\circ}\text{C}$ ,  $1,000\sim 2,000\times g$ , 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  $-20^{\circ}\text{C}$ , 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  $4^{\circ}\text{C}$  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 10 ng/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, 用移液器吸打数次, 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 10 ng/mL, 将 1 $\times$  标准品稀释液作为浓度 0 ng/mL。)

管号	稀释液用量 ( $\mu\text{L}$ )	复溶后标准品用量 ( $\mu\text{L}$ )	标准品的最终浓度 (ng/mL)
A	0	250	10
B	250	250	5
C	250	250 (从 B 管中取)	2.5
D	250	250 (从 C 管中取)	1.25
E	250	250 (从 D 管中取)	0.625
F	250	250 (从 E 管中取)	0.3125
G	250	0	0

**注意:** 标准品复溶加样后, 剩余部份请丢弃。

### ◆ 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  $4^{\circ}\text{C}$ ;

**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  $\mu\text{L}$ /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, 稀释比例一般为 2~8 倍, 如无明确范围, 建议从 4 倍开始稀释, 先在

孔中加入 50  $\mu\text{L}$  **样品分析缓冲液**，接着加入 50  $\mu\text{L}$  用 1 $\times$  标准品稀释液稀释后的样品，再进行检测，请注意记录好样品的稀释倍数；

**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 10 min，否则可能会影响检测结果。

8. 洗板 5 次，每孔 1 $\times$  洗涤液用量为 300  $\mu\text{L}$ ，注入与吸出间隔 15~30 s，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 Angiotensin-1 生物素化抗体** (100  $\mu\text{L}$ /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当适当延长。

10. 洗板 5 次，方法同步骤 8；

11. 加入 **HRP 标记的亲合素** (100  $\mu\text{L}$ /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** (100  $\mu\text{L}$ /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** (50  $\mu\text{L}$ /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

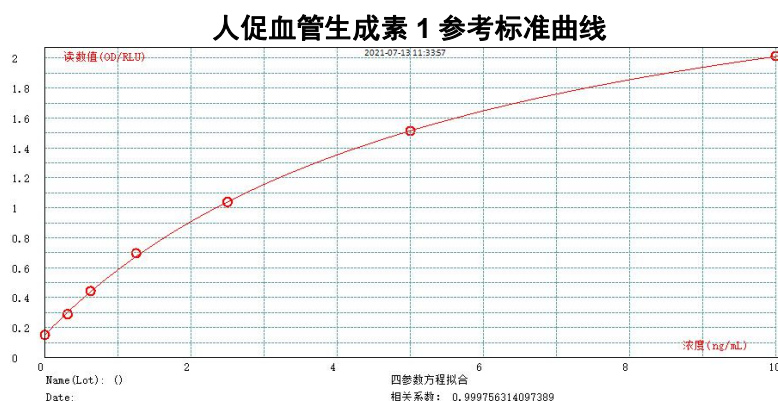
15. 绘制标准曲线。以标准品浓度作横坐标，OD 值作纵坐标，利用计算机软件作四参数逻辑 (4-PL) 曲线拟合创建标准曲线，通过样品的 OD 值即可在标准曲线上计算出其相应浓度。

**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



#### 注意事项

- 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；
- 严禁混用不同批号试剂盒的组分；
- 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；
- 说明书中提到的室温条件，请严格控制在 25~28 $^{\circ}\text{C}$ ；
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；
- 本产品仅限科研使用。

版本号：21C24