

人 D 因子酶联免疫吸附测定试剂盒

Human Complement factor D 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

HJ030 96次

产品特点

- 高灵敏度**——多次重复结果表明, 最小检出量为 29 pg/mL;
- 高特异性**——与人 Coagulation Factor II、Coagulation Factor X、Coagulation Factor XI 及小鼠和大鼠的 D 因子均无交叉反应;
- 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 D 因子的浓度。人 D 因子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 D 因子会与捕获抗体结合, 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 D 因子抗体后, 抗人 D 因子抗体与人 D 因子接合, 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 D 因子, 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 D 因子浓度与 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 D 因子的浓度。

背景简介

D 因子 (又名 Adipsin), 是一种属于肽酶 S1 家族的分泌蛋白, 其在许多组织中都有表达, 包括单核/巨噬细胞、肌肉组织、坐骨神经、子宫内膜、肾脏、肠等, 在脂肪组织中表达量尤其高。

D 因子作用于 C3bB, 可使此复合物中的 B 因子裂解, 形成 C3bBb, C3bBb 作为转化酶可使 C3 裂解为 C3a 和 C3b 从而激活补体系统的旁途径。

产品内容

组分	体积或数量
人D因子预包被板	12条
标准品稀释液 (5×)	20mL
人D因子标准品	≥2支 (冻干)
人D因子生物素化抗体	10mL
HRP标记的亲合素	10mL
浓缩洗涤液 (20×)	30mL
显色剂TMB	10mL
终止液	5mL
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 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 2,000 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 2,000 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	2,000
B	250	250	1,000
C	250	250 (从 B 管中取)	500
D	250	250 (从 C 管中取)	250
E	250	250 (从 D 管中取)	125
F	250	250 (从 E 管中取)	62.5
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。细胞上清样品一般建议用 1 \times 标准品稀释液稀释 5 倍后进行检测, 如果样品浓度过高, 超过检测范围, 请加大稀释倍数后重新检测; 对于血清或血浆样品, 需稀释 300 到 30,000 倍, 如无明确范围,

建议用 1×标准品稀释液从 2000 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 D 因子生物素化抗体**(100μL/孔，无需稀释)。用封板胶纸封住反应孔，室温孵育 60min；

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 20min；

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 10~20min；

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 540nm 或 570nm 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 10min 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。

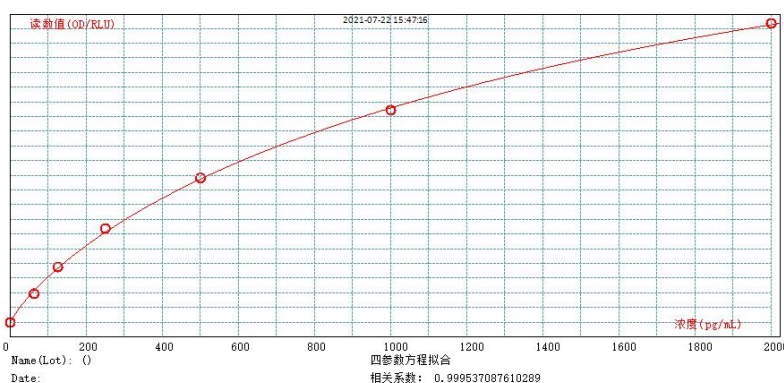
注意：① 复孔 OD 值在 20% 的差异范围内结果才有效，复孔 OD 值取平均后可作为测量值；

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

人 D 因子参考标准曲线



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