

# 人/大鼠/小鼠鸢尾素酶联免疫吸附测定试剂盒

## Human/Rat/Mouse Irisin 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

HJ217 96次

### 产品特点

- 高灵敏度**——多次重复结果表明，最小检出量为119 pg/mL；
- 高特异性**——与人 FNDC4、IL-20 Rβ、PTS、Lipocalin-2 等均无交叉反应；
- 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 法检测人/大鼠/小鼠来源血清、血浆或细胞培养上清液等样品中鸢尾素 (Irisin) 的浓度。Irisin 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 Irisin 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 Irisin 抗体后，抗 Irisin 抗体与 Irisin 结合，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 Irisin，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，Irisin 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 Irisin 的浓度。

### 背景简介

鸢尾素的前体蛋白是 FNDC 5 基因编码的含 III 型纤连蛋白结构域的蛋白 5，人的鸢尾素前体蛋白是由 212 个氨基酸组成的 I 型跨膜蛋白，其包括胞外部分 (121 个氨基酸)、跨膜区 (21 个氨基酸) 和胞内区 (39 个氨基酸)，其中胞外区经过合适的剪切即形成可溶性的鸢尾素。成熟的人、小鼠和大鼠的鸢尾素蛋白序列完全相同。

鸢尾素可以参与调控能量代谢、干细胞分化和神经元发育等生理过程，并能够诱导白色脂肪组织转化为代谢活跃的米色脂肪。在大脑中，鸢尾素能调控神经元细胞的分化和神经突的生长，此外，鸢尾素也参与了破骨细胞的分化等生理活动。

### 产品内容

组分	体积或数量
Irisin 预包被板	12 条
标准品稀释液 (5×)	20 mL
Irisin 标准品	≥2 支 (冻干)
Irisin 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 血清或血浆样品中因鸢尾素 (Irisin) 含量较高，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 8,000 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 8,000 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 ( $\mu\text{L}$ )	复溶后标准品用量 ( $\mu\text{L}$ )	标准品的最终浓度 (pg/mL)
A	0	250	8,000
B	250	250	4,000
C	250	250 (从 B 管中取)	2,000
D	250	250 (从 C 管中取)	1,000
E	250	250 (从 D 管中取)	500
F	250	250 (从 E 管中取)	250
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  $4^{\circ}\text{C}$ ；

**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，需稀释 10 到 200 倍，如无明确范围，建议用 1 $\times$  标准品稀释液从 20

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 **Irisin 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 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



**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