

# 大鼠/小鼠载脂蛋白 J 酶联免疫吸附测定试剂盒

## Rat/Mouse Apoprotein J ELISA Kit

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

### 货号规格

HJ218 96次

### 产品特点

- 高灵敏度**——多次重复结果表明, 最小检出量为 0.44 ng/mL;
- 高特异性**——与小鼠 Leptin、TGF-β R I /Fc Chimera、TGF-β R II 均无交叉反应, 与人 Clusterin 有 4.9% 的交叉反应性;
- 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 法检测大鼠及小鼠来源样品中载脂蛋白 J (Apoprotein J) 的浓度。载脂蛋白 J 捕获抗体已经预包被于酶标板上, 当加入样品或标准品时, 其中的载脂蛋白 J 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载脂蛋白 J 抗体后, 抗载脂蛋白 J 抗体与载脂蛋白 J 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, 若样品中存在载脂蛋白 J, 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, 载脂蛋白 J 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, 即可计算出样品中载脂蛋白 J 的浓度。

### 背景简介

载脂蛋白 J (Apo J, 又名聚集素、SGP-2 等) 是一种多功能性的蛋白, 由 Apo J $\alpha$  和 Apo J $\beta$  两个亚单位通过二硫键组成杂二聚体。聚集素前体蛋白包括两个卷曲的结构域、三个核心区定位结构域以及一个肝素结构域。成熟的小鼠 Apo J 与人和大鼠分别有 77% 和 93% 的同源性。Apo J 主要在成体的睾丸、卵巢、肾上腺、肝脏、心脏及大脑等上皮组织发育而成的器官中表达。

Apo J 还可作为分子伴侣帮助蛋白正确折叠, 其能降低阿尔海默茨患者体内的  $\beta$  淀粉样蛋白堆积, 破坏淀粉样蛋白斑块。此外, Apo J 也参与细胞增殖, 调亡及肿瘤化发展等多种生理过程。

### 产品内容

组分	体积或数量
载脂蛋白 J 预包被板	12 条
标准品稀释液 (5 $\times$ )	60 mL
载脂蛋白 J 标准品	$\geq 2$ 支 (冻干)
载脂蛋白 J 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 ( $4^{\circ}\text{C}$ ,  $1,000\sim 2,000\times g$ , 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 30 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 30 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	30
B	250	250	15
C	250	250 (从 B 管中取)	7.5
D	250	250 (从 C 管中取)	3.75
E	250	250 (从 D 管中取)	1.875
F	250	250 (从 E 管中取)	0.9375
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 1,000 到 25,000 倍，如无明确范围，建议用 1 $\times$  标准品稀释液

从 300 倍开始稀释, 如超出检测范围, 可加大稀释倍数重新检测;

**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×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 **载脂蛋白 J 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

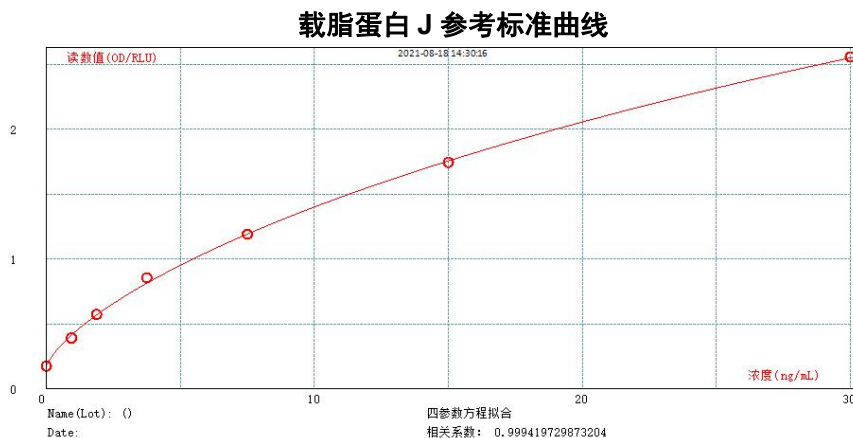
15. 绘制标准曲线。以标准品浓度作横坐标, OD 值作纵坐标, 利用计算机软件作四参数逻辑 (4-PL) 曲线拟合创建标准曲线, 通过样品的 OD 值即可在标准曲线上计算出其相应浓度。

**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