人胰岛素样生长因子结合蛋白4（C末端）酶联免疫吸附测定试剂盒

Human IGFBP-4（C-terminal Fragment）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

HJ054　　96次

产品特点

- **高灵敏度**——多次重复结果表明，最小检出量为1.25 ng/mL；
- **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法检测样品中人胰岛素样生长因子结合蛋白4（IGFBP-4）（C末端）的浓度。人IGFBP-4（C末端）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IGFBP-4（C末端）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，再加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的抗人IGFBP-4（C末端）抗体后，抗人IGFBP-4（C末端）抗体与人IGFBP-4（C末端）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。最后加入显色剂，若样品中存在人IGFBP-4（C末端），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IGFBP-4（C末端）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IGFBP-4（C末端）浓度。

背景简介

胰岛素样生长因子结合蛋白4（IGFBP-4）隶属于胰岛素样生长因子蛋白家族，在外周循环中参与血液游离IGFs浓度的调控。IGFBP-4与IGF的复合物可以被一种锌-金属蛋白酶PAPP-A裂解。IGFBP-4经PAPP-A酶切后会形成N末端（14.6 kDa）和C末端（11.3 kDa）两个片段，并且从IGF上释放出来。

近期的一些研究显示，外周循环中IGFBP-4片段水平与心肌缺血、Ⅰ型糖尿病和ST段抬高型心肌梗死（STEMI）患者院内主要不良心脏事件及致死率高度相关。

产品内容

组分	体积或数量
人IGFBP-4（C末端）预包被板	12条
标准品稀释液（5×）	10 mL
人IGFBP-4（C末端）标准品	≥2支（冻干）
HRP标记的人IGFBP-4（C末端）抗体	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 100~500×*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 0.5~2 h，待其自然凝固并析出血清后，离心取黄色上清即可（4℃，1,000~2,000×*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℃，1,000~2,000×*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 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℃，避免反复冻融；
   ② 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；
   ③ 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℃保存；
3. 将 **浓缩洗涤液（20×）** 用双蒸水或去离子水稀释为 1×洗涤液；
4. 将 **标准品稀释液（5×）** 用双蒸水或去离子水稀释为 1×标准品稀释液；
5. 按标准品标签上注明的复溶体积，用1×标准品稀释液复溶使标准品终浓度达到1,000 ng/mL，室温操作，请严格控制在 25~28℃，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×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 1,000 ng/mL，将 1×标准品稀释液作为浓度 0 ng/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（ng/mL）
A	0	250	1,000
B	250	250	500
C	250	250（从 B 管中取）	250
D	250	250（从 C 管中取）	125
E	250	250（从 D 管中取）	62.5
F	250	250（从 E 管中取）	31.25
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℃；

   注意：① 标准品和样品建议做双复孔检测；
   ② 建议设置本底较正孔，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。如果样品浓度超出本试剂盒的最高或者最低标准品浓度范围，请适当稀释或浓缩后再进行检测；

   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 300 μL，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 **HRP 标记的人 IGFBP-4（C 末端）抗体**（100 μL/孔，无需稀释）。用封板胶纸封住反应孔，室温孵育 60 min；
10. 洗板 5 次，方法同步骤 8；
11. 加入 **显色剂 TMB**（100 μL/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。

12. 加入 **终止液**（50 μL/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

13. 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。

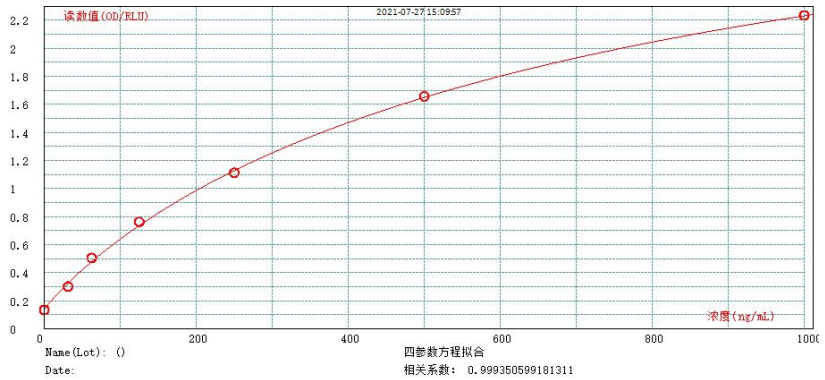
    注意：① 复孔 OD 值在 20%的差异范围内结果才有效，复孔 OD 值取平均后可作为测量值；

    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 IGFBP-4（C 末端）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