

# 人转铁蛋白酶联免疫吸附测定试剂盒

Human Transferrin/TF ELISA Kit

本产品需冰袋运输。保存于4℃，保质期6个月；保存于-20℃，保质期12个月。

## 产品参数

|      |                       |
|------|-----------------------|
| 货号   | HJ426                 |
| 规格   | 96次                   |
| 检测范围 | 0.78 ng/mL~50 ng/mL   |
| 敏感性  | 27 pg/mL              |
| 特异性  | 系统和其它因子无交叉反应          |
| 样本类型 | 人血清、血浆、体液、组织匀浆或细胞培养上清 |

## 产品简介

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法检测样品中人 Transferrin 的浓度。人 Transferrin 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 Transferrin 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,再加入生物素标记的人 Transferrin 抗体后,抗人 Transferrin 抗体与人 Transferrin 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。随后加入酶复合物,生物素与酶复合物特异性结合,这样酶复合物上的 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 Transferrin,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,读取 450 nm 处的 OD 值,人 Transferrin 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 Transferrin 的浓度。

## 背景简介

转铁蛋白 (Transferrin, 简称 TF), 转铁蛋白是一种铁结合蛋白,主要负责在体内运输铁离子。它通过与转铁蛋白受体 (TfR) 结合,将铁离子从肠道吸收部位运输到骨髓、肝脏和脾脏等组织。转铁蛋白能够螯合游离的铁离子,防止其形成活性氧自由基,从而保护细胞免受氧化损伤。转铁蛋白是先天免疫系统的一部分,通过结合铁离子来抑制细菌的生长。转铁蛋白在细胞的增殖和分化过程中也发挥重要作用,尤其是在红细胞生成过程中。

产品内容

| 组分                    | 体积或数量           |
|-----------------------|-----------------|
| 人Transferrin预包被板      | 8孔条×12个         |
| 样品稀释液                 | 30 mL           |
| 重组人Transferrin标准品(冻干) | 2支(50 ng/支)     |
| 生物素标记人Transferrin抗体   | 130 μL(效价1:100) |
| 抗体稀释液                 | 12 mL           |
| 酶复合物(HRP标记的链霉亲和素)     | 130 μL(效价1:100) |
| 酶复合物稀释液               | 12 mL           |
| 浓缩洗涤液(25×)            | 30 mL           |
| 显色剂TMB                | 10 mL           |
| 终止液                   | 10 mL           |
| 封板胶纸                  | 4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；
  - D. **组织匀浆/体液**：离心去除沉淀即可。

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。

2. 稀释样品

查阅相关文献，预估样品中待测因子的含量，从而确定适当的稀释倍数，使稀释后样品中待测因子的浓度处于 ELISA 试剂盒的最佳检测范围。根据待测因子含量的不同，分别采取不同的稀释方案：

- ① 待测因子含量在 500~5,000 ng/mL 范围内，一般按 1:100 稀释，即向 297 μL 样品稀释液中加入 3 μL 样品；
- ② 待测因子含量在 50~500 ng/mL 范围内，一般按 1:10 稀释，即向 225 μL 样品稀释液中加入 25 μL 样品；
- ③ 待测因子含量在 0.78~50 ng/mL 范围内，一般按 1:2 稀释，即向 100 μL 样品稀释液中加入 100 μL 样品；
- ④ 待测因子含量≤0.78 ng/mL，样品一般无需稀释。

以上方案仅供参考，实验中请详细记录样品的稀释方法。



### 检测准备工作

3. 试剂盒自 4℃冰箱取出后,请置于室温平衡 20 min; 如从 -20℃取出,各组分需彻底融化后再平衡 20 min; 检测完成后,剩余试剂请及时置于 4℃或 -20℃保存;
4. 将 **浓缩洗涤液(25×)** 用双蒸水或去离子水稀释成1×洗涤液;
5. 重组人Transferrin标准品的稀释和使用(在使用前2 h内准备, 室温操作, **请严格控制在25~28℃**)
  - ① 配制 50 ng/mL 标准品: 取 1 mL 样品稀释液加入标准品管内,盖好后静置 15 min 以上,然后反复颠倒 / 搓动以助溶解;
  - ② 按下表将 50 ng/mL 标准品用样品稀释液进行倍比梯度稀释。(最高浓度为 50 ng/mL,将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         | 1,000        | 50              |
| B  | 300       | 300(从A管中取)   | 25              |
| C  | 300       | 300(从B管中取)   | 12.5            |
| D  | 300       | 300(从C管中取)   | 6.25            |
| E  | 300       | 300(从D管中取)   | 3.12            |
| F  | 300       | 300(从E管中取)   | 1.56            |
| G  | 300       | 300(从F管中取)   | 0.78            |
| H  | 300       | 0            | 0               |

**注意:** 标准品复溶加样后, 剩余部分请丢弃。

6. 准备生物素标记人 Transferrin 抗体工作液
  - ① 按每孔需添加 100 μL 抗体工作液,计算其总用量 (为弥补操作中的损耗,需多配制 100~200 μL);
  - ② 按 1 μL **生物素标记人 Transferrin 抗体** 添加 99 μL **抗体稀释液** 的比例配制工作液,轻轻混匀。
7. 准备酶复合物工作液 (需在使用前 1 h 内准备)
  - ① 按每孔需添加 100 μL 酶复合物工作液,计算其总用量 (为弥补操作中的损耗,需多配制 100~200 μL);
  - ② 按 1 μL **酶复合物** 添加 99 μL **酶复合物稀释液** 的比例配制工作液,轻轻混匀。

### 检测流程

8. 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℃或-20℃;  
**注意:** ① **标准品和样品建议做双复孔检测;**  
② **每次实验均需绘制标准曲线。**
9. 将用样品稀释液稀释后的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,37℃孵育 90 min;  
**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,若其大于本试剂盒标准曲线的最大标准品浓度,请将样品适当稀释后再进行检测;**  
② **整个加样过程不宜超过 10 min,否则可能会影响检测结果。**
10. 甩去酶标板内液体,无需洗板,将板倒扣在吸水纸上拍干;
11. 加入稀释后的生物素标记人 Transferrin 抗体工作液 (100 μL/ 孔 ),用封板胶纸封住反应孔,37℃孵育 60 min;

12. 洗板 5 次, 每孔 1× 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。
13. 加入稀释后的酶复合物 (100  $\mu\text{L}$ / 孔), 用封板胶纸封住反应孔, 37°C 避光孵育 30 min;
14. 洗板 5 次, 方法同步骤 12;
15. 加入 显色剂 TMB (100  $\mu\text{L}$ / 孔), 用封板胶纸封住反应孔, 避光 37°C 反应 10~25 min;  
注意: ① 在保存和使用时, 请勿将 TMB 接触氧化剂和金属;  
② 因实验室条件差异, 最佳显色时间会有所不同, 反应充分时肉眼可见标准品的前 3~4 孔有明显的梯度蓝色。
16. 加入 终止液 (100  $\mu\text{L}$ / 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。

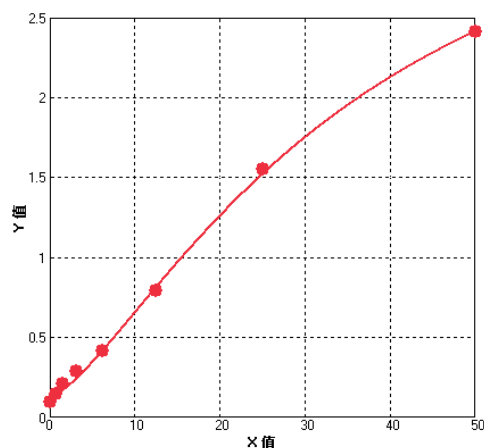
## 数据分析

17. 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 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Transferrin参考标准曲线

| 标准品浓度      | O.D.  |
|------------|-------|
| 0 ng/mL    | 0.092 |
| 0.78 ng/mL | 0.142 |
| 1.56 ng/mL | 0.207 |
| 3.12 ng/mL | 0.288 |
| 6.25 ng/mL | 0.416 |
| 12.5 ng/mL | 0.789 |
| 25 ng/mL   | 1.550 |
| 50 ng/mL   | 2.412 |



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°C;
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。