

人CNPY2双抗夹心ELISA检测试剂盒

请在实验前仔细阅读本说明书

产品货号: KE00073
规格: 96T
灵敏度: 0.01 ng/mL
检测范围: 0.156 - 10 ng/mL
用途: 此试剂盒用于定量检测血清、血浆、细胞上清以及细胞裂解液中人CNPY2浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

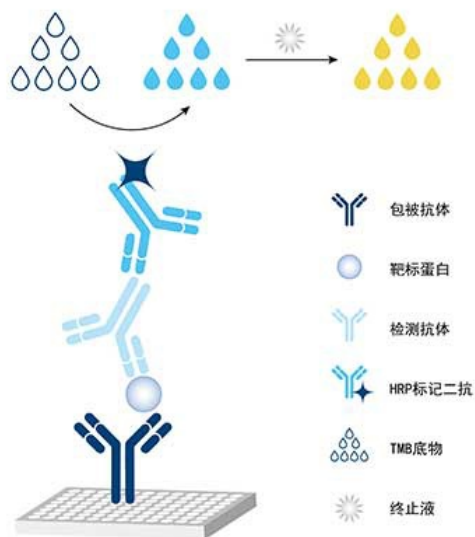
目录

一：背景信息	3
二：检测原理	3
三：需自备的实验器材	3
四：试剂盒组分及储存	4
五：实验注意事项	4
六：样本准备	4
七：试剂准备	5
八：实验步骤	6
九：实验参数	7
9.1 参考标曲图	7
9.2 精密度	7
9.3 加标回收率	7
9.4 样本值	8
9.5 灵敏度	8
9.6 线性	8
十：参考文献	8

一：背景信息

CNPY2, 也称为MSAP、TMEM4和ZSIG9, 是神经轴突生长的正调节剂 (PMID: 12826659)。它与细胞骨架桥接蛋白 (ezrin-radixin-moesin, ERM) 样肌球蛋白调节轻链相互作用蛋白 (MIR) 相互作用, 这两种蛋白质共定位于细胞系和原代神经元中。CNPY2是一种受HIF-1 α 调节的分泌性血管生成生长因子, 可促进平滑肌细胞迁移、增殖和组织血运重建 (PMID: 25589425)。CNPY2增强成纤维细胞中的细胞扩散和大鼠C6神经胶质瘤细胞的迁移 (PMID: 15905959)。CNPY2还影响低密度脂蛋白受体和FGF21的表达 (PMID: 22378787)。该试剂盒用于体内CNPY2定量。

二：检测原理



◀双抗夹心模式图 (检测抗体不标记)

按操作顺序形成抗体夹心结构后, 加入TMB底物, 板孔液体由无色变成蓝色, 再加入终止液液体变为黄色后进行吸光度值测定。

三：需自备的实验器材

- 3.1 酶标仪 (可读取450 nm和630 nm双波长);
- 3.2 高精度移液器及一次性移液器枪头;
- 3.3 洗板机 (亦可手动洗板);
- 3.4 EP管 (用于稀释标准品及样本);
- 3.5 吸水毛巾或滤纸 (用于拍干);
- 3.6 烧杯和量筒;
- 3.7 用于ELISA实验的数据分析的统计拟合软件 (推荐四参数拟合方法), 如: Origin, ELISA Calc等。

四：试剂盒组分及储存

英文名称	中文名称	规格	数量
Microplate	预包被酶标板 - 96孔板	8孔 × 12条	1 块
Protein standard	标准品 - 冻干粉状 *	20 ng/瓶	2 瓶
Detection antibody (100×)	检测抗体浓缩液 (100×) **	120 μL/支	1 支
HRP-conjugated antibody (100×)	HRP标记二抗浓缩液 (100×) **	120 μL/支	1 支
Sample Diluent PT 5-eg	样本稀释液 PT 5-eg	30 mL/瓶	1 瓶
Detection Diluent	抗体稀释液	30 mL/瓶	1 瓶
Wash Buffer Concentrate (20×)	浓缩洗涤液 (20×)	30 mL/瓶	1 瓶
Extraction Reagent	裂解液	30 mL/瓶	1 瓶
Tetramethylbenzidine Substrate (TMB)	显色底物 TMB	12 mL/瓶	1 瓶
Stop Solution	终止液	12 mL/瓶	1 瓶
Plate Cover Seals	封板膜		4 张

储存条件：

- 1：未开启试剂盒可在2-8℃条件下存放6个月或者在-20℃条件下存放1年
- 2：已开启试剂盒可在2-8℃存放7天
- 3：每次实验均使用新的标准品,使用后丢弃

* 使用对应的样本稀释液对标准品进行复溶，复溶过程避免产生气泡

** 开盖前请离心

五：实验注意事项

- 5.1 避免皮肤接触终止液以及TMB 显色液；
- 5.2 在实验过程中，注意穿戴个人防护装备，如实验服，手套，口罩和护目镜；
- 5.3 请勿将不同批次的试剂进行混用，过期产品请勿使用；
- 5.4 在使用自动洗板机时，板孔加入洗涤液之后，设置30秒的浸泡程序，以提高分析的精确度。

六：样本准备

- 6.1 血清：全血标本室温凝固 30 min后1000×g 离心15 min，取上清立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融。
- 6.2 血浆：可用EDTA、肝素或柠檬酸盐作为抗凝剂，标本采集后1000×g 离心15 min，立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融（注意：标本溶血会影响检测结果，因此溶血标本不宜进行检测）。
- 6.3 细胞上清：收集细胞培养液，500×g 离心5 min取上清，立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融。
- 6.4 细胞裂解液：收集细胞后，用预冷(2-8℃)的1×PBS洗3次，500×g离心5 min。细胞计数，离心弃上清；加PMSF至细胞裂解液中，终浓度为1 mM；按每 1×10^7 个细胞，加入1 mL细胞裂解液(含PMSF)，冰上裂解30 min，其间上下颠倒使裂解更充分，超声波破碎处理，8000×g-10000×g离心5 min，分离上清，分装后-80℃存放，并用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定总蛋白浓度，避免反复冻融。

七：试剂准备

7.1 洗涤液 (1×)：

如果洗涤液 (20×) 有晶体析出, 37°C加热至晶体全部溶解。按1:20稀释倍数进行稀释: 如取30 mL 浓缩洗涤液 (20×), 加入570 mL 超纯水或去离子水, 得到洗涤液 (1×)。

7.2 检测抗体 (1×)：

开盖前瞬时离心, 按1:100比例进行稀释, 稀释前根据预先计算实验所需的总量配制 (100 μL/孔), 实际配制时应多配制0.1-0.2 mL。如10 μL 检测抗体浓缩液 (100×) 加 990 μL 抗体稀释液进行配制, 轻轻混匀。

7.3 HRP标记二抗 (1×)：

开盖前瞬时离心, 按1:100比例进行稀释, 稀释前根据预先计算实验所需的总量配制 (100 μL/孔), 实际配制时应多配制0.1-0.2 mL。如10 μL HRP标记二抗浓缩液 (100×) 加 990 μL 抗体稀释液进行配制, 轻轻混匀。

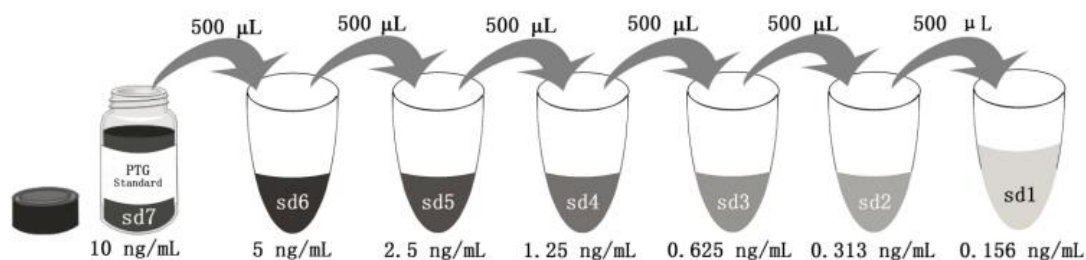
7.4 待检测样本：

不同的样本使用相应的样本稀释液进行稀释, 如果样本检测值超过标曲最高范围, 可将样本进行一定的稀释后再进行实验, 使样本的检测值处于标曲范围内, 不同样本的稀释倍数需自行优化。

稀释比推荐如下: 人血清和血浆样本1:4稀释; 细胞裂解液样本1:100稀释; 样品采集、处理和储存的差异可能导致测值的改变。

7.5 梯度稀释的标准品：

用2 mL PT 5-eg 样本稀释液复溶标准品, 具体操作如下:



Add # μL of Standard diluted in the previous step	—	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL
# μL of Sample Diluent PT 5-eg	2000 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL
	"sd7"	"sd6"	"sd5"	"sd4"	"sd3"	"sd2"	"sd1"

八：实验步骤

实验前,需要将所需试剂在室温平衡20-30 min(检测抗体 浓缩液、HRP标记二抗浓缩液不需要平衡室温,即用即取);在进行标准品、样本以及不同试剂加样时,更换枪头,避免接触微孔板的内表面,不同的试剂,使用不同的加样槽;

8.1 根据实验用量,取出需要用到的酶标板条,剩余板条加入干燥剂放入铝箔袋密封后存放于4°C,并于一周之内用完;

8.2 加样,分别设零孔、标准孔、待测样本孔。零孔加样本稀释液100 μL,余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本100 μL/孔,注意不要产生气泡(建议标准品和样本都做复孔,尽量避免实验误差,确保上样不间断,5-10 min完成加样);

8.3 酶标板上覆膜,37°C孵育2 h;

8.4 洗涤

1) 揭开封板膜(动作轻柔,避免动作过大导致液体溢出串孔),弃液体,拍干;

2) 洗涤液(1×)洗涤板条,每孔350-400 μL,洗涤后,甩掉液体拍干板条,重复此步骤4次,避免异物进入板孔以及板条干燥;

8.5 每孔加100 μL 检测抗体(1×)(参照试剂准备部分7.2),盖上封板膜,37°C孵育1 h;

8.6 重复步骤8.4;

8.7 每孔加100 μL HRP标记二抗(1×)(参照试剂准备部分7.3),盖上封板膜,37°C孵育40 min;

8.8 重复步骤8.4;

8.9 显色:每孔加TMB显色液100 μL,37°C避光显色15-20 min(如果颜色偏浅,可适当延长显色时间,不超过30 min;保持显色底物始终处于避光状态,显色底物在加样前应是无色透明,如有变色,请勿使用);

8.10 终止:每孔加终止液100 μL,蓝色变黄色。终止液与TMB显色液的加样顺序一致;(注意:眼睛和皮肤避免接触终止液)

8.11 读数:以630 nm为校正波长,用酶标仪在450 nm波长测量各孔的光密度(OD值)。加入终止液后5 min内进行读数,若无630 nm 波长,也可直接使用450 nm 波长读数;

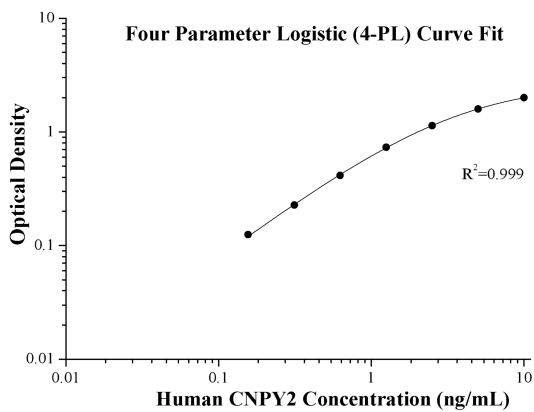
8.12 数据分析:每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值,设置复孔,取其平均值。以标准品的浓度为横坐标,OD 值为纵坐标,使用专业软件(如Origin、ELISACalc等)进行四参数拟合(4-PL),根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度,乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

操作流程如下:

步骤	试剂	体积	孵育时间	洗涤次数	孵育温度
1	标准品或样本	100 μL	120 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
2	检测抗体(1×)	100 μL	60 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
3	HRP标记二抗(1×)	100 μL	40 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
4	显色 TMB	100 μL	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37°C孵育,避光
5	终止液	100 μL	0 分钟	不需要洗涤	-
6	加入终止液后以630 nm为校正波长,在450 nm处测量OD值,此过程建议不超过5分钟				

九：实验参数

9.1 参考标曲图



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.052 0.058	0.055	-
0.156	0.182 0.178	0.18	0.125
0.313	0.275 0.289	0.282	0.227
0.625	0.458 0.48	0.469	0.414
1.25	0.819 0.759	0.789	0.734
2.5	1.215 1.169	1.192	1.137
5	1.652 1.639	1.646	1.591
10	2.02 2.092	2.056	2.001

9.2 精密度

板内精密度：3个不同浓度的样本在板内重复测定 20次；

板间精密度：3个不同浓度的样本在板间重复测定 24次。

板内精密度 (CV内)				
样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%
1	20	0.96	0.08	8.2
2	20	1.83	0.11	6.2
3	20	6.17	0.50	8.0

板间精密度 (CV间)				
样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%
1	24	0.61	0.05	8.7
2	24	1.74	0.17	9.5
3	24	5.20	0.47	9.1

9.3 加标回收率

样本稀释后，在标曲范围内选择高、中、低3个浓度，进行人CNPY2的加标回收率实验，结果如下：

样本类型	稀释倍数	均值(%)	范围(%)
人血浆	1:4	113	106-119
	1:8	96	84-111
细胞上清	1:2	86	80-94
	1:4	90	87-95
细胞裂解液	1:100	95	83-108
	1:200	99	80-124

9.4 样本值

	样本1	样本2	样本3
Hepg2细胞裂解液 (1 x 10 ⁷ cells)	3.5 ng/mL	4.2 ng/mL	2.3 ng/mL
Hela细胞裂解液 (1 x 10 ⁷ cells)	54.0 ng/mL	71.0 ng/mL	66.0 ng/mL

9.5 灵敏度

用20个重复的零孔平均OD值加上两倍标准差得到的OD值带入标准曲线拟合出对应的浓度值，此试剂盒中人CNPY2的灵敏度为 0.01 ng/mL。

9.6 线性

人血浆和细胞裂解液加入高浓度的人CNPY2蛋白，梯度稀释后检测样本加标线性，线性数据如下：

(人血浆样本预先稀释2倍，细胞裂解液样本预先稀释50倍)

稀释倍数		人血浆	细胞裂解液
1:2	均值 (%)	95	99
	范围 (%)	88-102	84-113
1:4	均值 (%)	93	96
	范围 (%)	91-95	91-101
1:8	均值 (%)	101	92
	范围 (%)	99-103	89-95
1:16	均值 (%)	101	97
	范围 (%)	100-101	94-100

十：参考文献

1. Bornhauser BC et al., MSAP is a novel MIR-interacting protein that enhances neurite outgrowth and increases myosin regulatory light chain. J Biol Chem 2003 278: 35412-35420.
2. Jian Guo et al., A Secreted Protein (Canopy 2, CNPY2) Enhances Angiogenesis and Promotes Smooth Muscle Cell Migration and Proliferation. Cardiovasc Res 2015 105 (3): 383-93.
3. Bornhauser BC et al., MSAP enhances migration of C6 glioma cells through phosphorylation of the myosin regulatory light chain. Cell Mol Life Sci CMLS 2005 62: 1260-1266.
4. Do HT et al., Fibroblast growth factor-21 (FGF21) regulates low-density lipoprotein receptor (LDLR) levels in cells via the E3-ubiquitin ligase Mylip/Idol and the Canopy2 (Cnpy2)/Mylip-interacting saposin-like protein (Msap). J Biol Chem 2012 287: 12602-12611.

