

## 人Leptin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: KE00095

规格: 96T

灵敏度: 2.0 pg/mL

检测范围: 15.6 - 500 pg/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Leptin浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

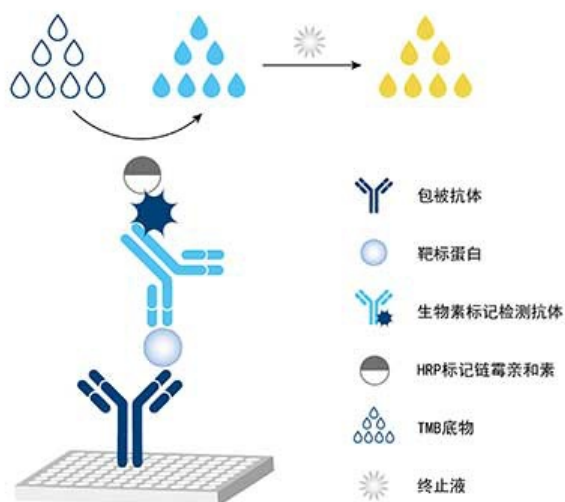
# 目录

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

瘦素 (Leptin) 是肥胖基因表达的蛋白质产物, 主要由脂肪细胞分泌, 通过与其受体结合而发挥作用。通过与下丘脑部位相应受体的结合, 瘦素 (Leptin) 参与调节机体对食物摄入、能量消耗、脂肪代谢等过程, 该基因和/或其调节区域的突变会导致严重肥胖, 以及伴随性腺功能减退的病态肥胖。另外, 由于其在致癌、促炎和促血管生成中的作用, 瘦素 (Leptin) 也被证明在肿瘤发生、肿瘤进展和转移中发挥重要作用。最近研究发现, 瘦素 (Leptin) 还在机体的神经内分泌、生殖、免疫活动等调节过程中发挥着重要作用。

## 二：检测原理



### ◀双抗夹心模式图 (检测抗体标记生物素)

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 *	500 pg/瓶	2 瓶
Detection Antibody, biotinylated (100×)	生物素标记检测抗体浓缩液 (100×) **	120 µL/支	1 支
Streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) (100×)	HRP标记链霉亲和素浓缩液 (100×) **	120 µL/支	1 支
Sample Diluent PT 1-ef	样本稀释液 PT 1-ef	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°C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°C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°C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°C)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 $1 \times 10^7$ 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°C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 标记链霉亲和素 (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 标记的链霉亲和素浓缩液 (100×) 加 990 μL 抗体稀释液进行配制，轻轻混匀。

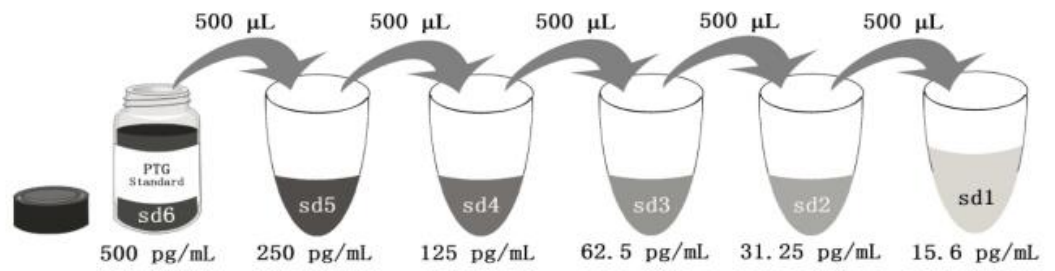
### 7.4 待检测样本：

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1:50稀释；细胞裂解液样本1:4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1 mL PT 1-ef 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
# µL of Sample Diluent PT 1-ef	<b>1000 µL</b>	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
	"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标记链霉亲和素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 酶标板盖上覆膜,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标记链霉亲和素(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;

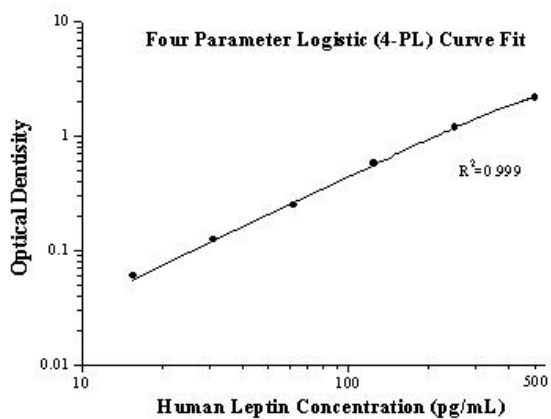
8.12 数据分析:每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值,设置复孔,取其平均值。以标准品的浓度为横坐标,OD值为纵坐标,使用专业软件(如Origin、ELISACalc等)进行四参数拟合(4-PL),根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度,乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

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标记链霉亲和素(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



(pg/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.017 0.017	0.017	-
15.6	0.068 0.086	0.077	0.06
31.3	0.14 0.141	0.141	0.124
62.5	0.277 0.258	0.268	0.251
125	0.591 0.59	0.591	0.574
250	1.226 1.183	1.205	1.188
500	2.2 2.227	2.214	2.197

### 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 (pg/mL)	标准差	变异系数CV%
1	20	79.7	2.8	3.5
2	20	182.7	5.8	3.2
3	20	461.7	20.9	4.5

板间精密度 (CV间)				
样本	数量	平均值 (pg/mL)	标准差	变异系数CV%
1	24	84.3	1.9	2.2
2	24	185.1	4.6	2.5
3	24	461.7	15.4	3.3

### 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Leptin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	1:50	96	89 - 100
	1:100	92	82 - 113
细胞上清	1:2	97	87 - 111
	1:4	98	80-117



## 9.4 样本值

应用此试剂盒检测健康人血清样本中人Leptin浓度，结果如下：

样本类型	均值 (pg/mL)	范围 (pg/mL)
人血清 (n=32)	6192	1276 - 19652

应用本试剂盒，检测细胞裂解液样本，结果如下：

Leptin/总蛋白	3T3-L1 细胞裂解液
(pg/mg)	40.9

## 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Leptin的灵敏度为 2.0 pg/mL。

## 9.6 线性

细胞上清样本加入高浓度的人Leptin蛋白，梯度稀释后检测样本加标线性，人血浆样本用对应样本稀释液稀释样本，使稀释后的检测值处于标曲范围内，线性数据如下：

(人血浆样本预先稀释5倍)

稀释倍数		人血浆	细胞上清
1:2	均值 (%)	87	104
	范围 (%)	86 - 88	94 - 114
1:4	均值 (%)	100	102
	范围 (%)	98-101	91 - 114
1:8	均值 (%)	97	99
	范围 (%)	93 - 101	90 - 109
1:16	均值 (%)	95	102
	范围 (%)	89 - 102	94 - 111

## 十：参考文献

1. Arnold M. et al. (2016) Cancer Epidemiol. 41:8-15.
2. Zhang Y. et al. (1994) Nature. 37:425-32.
3. de Luis DA. et al. (2009) Minerva Med. 229-36.
4. Jiang N. et al.(2014) Drug Des Devel Ther. 8:2295-302.
5. Vansaun MN. et al.(2013) Clin Cancer Res. 19:1926-1932.