

## 人Kininogen 1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: KE00608  
规格: 96T  
灵敏度: 0.06 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、血浆以及唾液中的人Kininogen 1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	8
9.4 样本值	8
9.5 灵敏度	8
9.6 线性	8
9.7 特异性	8
十：参考文献	9

## 一：背景信息

Kininogen 1是一种多结构域糖蛋白，存在于大多数脊椎动物的血液中。Kininogen 1是钾likrein-kinin系统（KKS）的关键组成部分，与凝血因子XI共同构成血液凝固接触激活系统（CAS），也称为凝血内在途径。该系统主要在病理条件下促进凝血酶的产生，并且可以独立于组织因子（TF）外源性途径运作。已发现激肽原-1及其片段具有多种生物学功能。例如，Kininogen 1可以调节白细胞募集，其结构域5（kininostatatin）可以下调内皮细胞的增殖和迁移，抑制血管生成。此外，kininogen 1已被确定为早期检测晚期结直肠腺瘤和结直肠癌的潜在生物标志物。

## 二：检测原理



### ◀双抗夹心模式图 (检测抗体直标HRP)

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, HRP-conjugated (100×)	HRP标记检测抗体浓缩液 (100×) **	120 μL/支	1 支
Sample Diluent PT 4B1	样本稀释液 PT 4B1 (用于人血清和血浆样本)	30 mL/瓶	2 瓶
Sample Diluent PT 3	样本稀释液 PT 3 (用于唾液样本)	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
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
<b>储存条件：</b> 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 唾液：收集唾液后10000×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。

## 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 HRP标记检测抗体 (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 HRP标记检测抗体浓缩液 (100×) 加 990 μL **抗体稀释液**进行配制, 轻轻混匀。

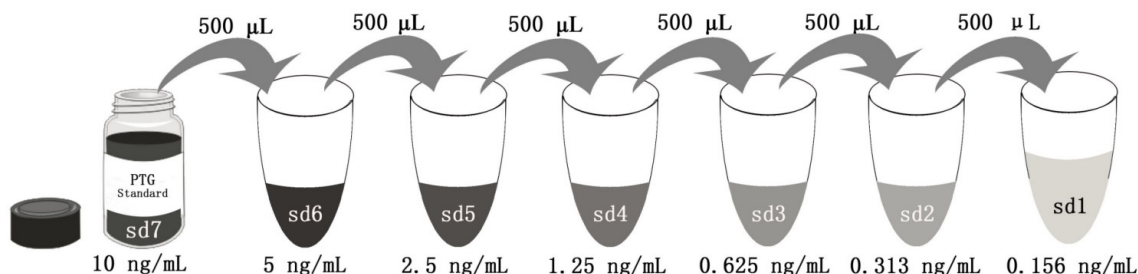
### 7.3 待检测样本：

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1:10000稀释; 唾液样本1:4或1:8稀释; 样品采集、处理和储存的差异可能导致测值的改变。

### 7.4 梯度稀释的标准品：

检测人血清和血浆样本, 用2 mL PT 4B1样本稀释液复溶标准品; 检测唾液样本, 用2 mL PT 3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 4B1 or PT 3	<b>2000 μL</b>	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20-30min（HRP标记检测抗体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 HRP标记检测抗体（1×）（参照试剂准备部分7.2），盖上封板膜，37°C孵育40 min；

8.6 重复步骤8.4；

8.7 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）；

8.8 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）

8.9 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；

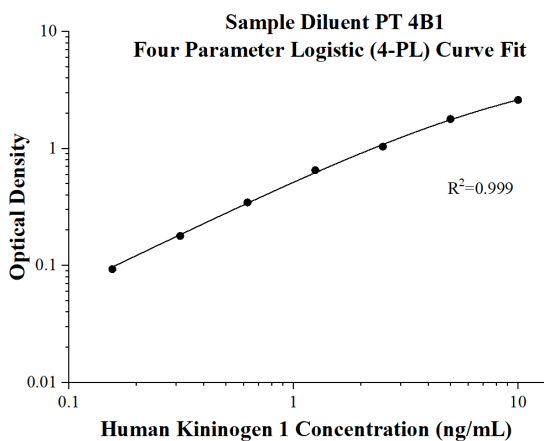
8.10 数据分析：每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD值为纵坐标，使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

操作流程如下：

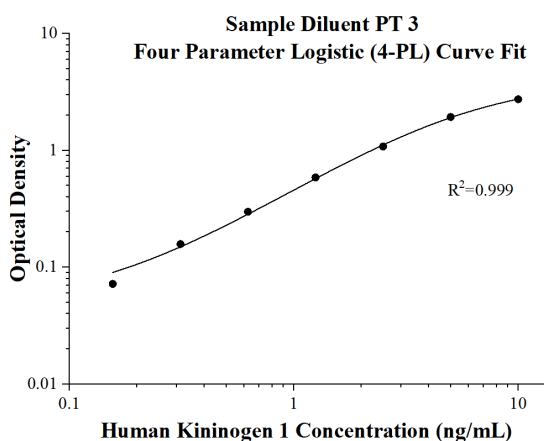
步骤	试剂	体积	孵育时间	洗涤次数	孵育温度
1	标准品或样本	100 μL	120 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
2	HRP标记检测抗体（1×）	100 μL	40 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
3	显色 TMB	100 μL	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37°C孵育，避光
4	终止液	100 μL	0 分钟	不需要洗涤	-
5	加入终止液后以630 nm为校正波长，在450 nm处测量OD值，此过程建议不超过5分钟				

## 九：实验参数

### 9.1 参考标曲图



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.0639 0.0591	0.062	-
0.156	0.1609 0.1473	0.154	0.093
0.313	0.239 0.2424	0.241	0.179
0.625	0.3886 0.4254	0.407	0.346
1.25	0.7386 0.6895	0.714	0.653
2.5	1.0883 1.1135	1.101	1.039
5	1.7828 1.9178	1.85	1.789
10	2.6847 2.6486	2.667	2.605



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.0583 0.051	0.055	-
0.156	0.1278 0.1251	0.126	0.072
0.313	0.2105 0.2155	0.213	0.158
0.625	0.3635 0.3422	0.353	0.298
1.25	0.6341 0.6484	0.641	0.587
2.5	1.1472 1.1222	1.135	1.08
5	1.9751 1.9954	1.985	1.931
10	2.7752 2.8172	2.796	2.742

### 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 8 次;

板间精密度: 3个不同浓度的样本在板间重复测定 16 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	8	5.23	0.51	9.67
2	8	1.15	0.10	8.73
3	8	0.66	0.05	7.89

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	16	5.09	0.45	8.87
2	16	1.15	0.11	9.67
3	16	0.62	0.05	8.78

### 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Kininogen 1的加标回收率实验，结果如下：

样本类型	稀释倍数	平均值 (%)	范围 (%)
人血清	1:80000	94	92-99
唾液	1:8	107	93-122

### 9.4 样本值

人血清/唾液 - 应用本试剂盒，检测人血清和唾液样本中人Kininogen 1的浓度。

样本类型	均值 (ng/mL)	范围 (ng/mL)
人血清样本 (n=16)	35640.39	15510.54-65694.32
唾液样本 (n=8)	2.82	1.44-5.78

### 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Kininogen 1的灵敏度为0.06 ng/mL。

### 9.6 线性

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：

(人血清样本预先稀释5000倍，唾液样本预先稀释2倍。)

		人血清 (样本稀释液 PT 4B1)	唾液 (样本稀释液 PT 3)
1:2	均值 (%)	100	100
	范围 (%)	-	-
1:4	均值 (%)	100	111
	范围 (%)	95-104	110-112
1:8	均值 (%)	105	123
	范围 (%)	100-110	122-124
1:16	均值 (%)	103	122
	范围 (%)	100-105	121-123

### 9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人Kininogen 1。

## 十：参考文献

1. Ponczek, Michał B. International journal of molecular sciences vol. 22,24 13370. 13 Dec. 2021.
2. Khan, Mohammad M et al. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology vol. 26,10 (2006): 2260-6.
3. Xu, Jinfang et al. Journal of experimental & clinical cancer research : CR vol. 37,1 180. 2 Aug. 2018.