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： KE00510

规 格： 96T

灵敏度： 0.1 pg/mL

检测范围: 31.25-2000 pg/mL

用 途： 此试剂盒用于定量检测血清、血浆以及细胞裂解液中的人Leptin浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

目录

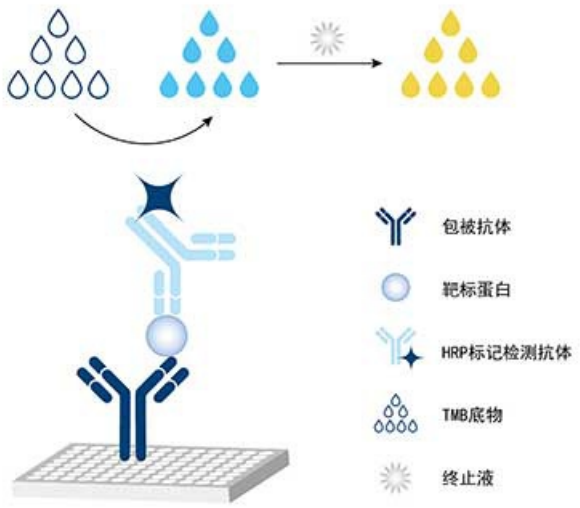
一：背景信息 3
二：检测原理 3
三：需自备的实验器材 3
四：试剂盒组分及储存 4
五：实验注意事项 4
六：样本准备 4
七：试剂准备 5
八：实验步骤 6
九：实验参数 7
9.1 参考标曲图 7
9.2 精密度 7
9.3 加标回收率 8
9.4 样本值 8
9.5 灵敏度 8
9.6 线性 8
9.7 特异性 9
十：参考文献 9

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

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，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，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，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。

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

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 *	4000 pg/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（用于血清和血浆样本）	30 mL/瓶	1 瓶
Sample Diluent PT 1	样本稀释液 PT 1（用于细胞裂解液样本）	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
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°C条件下存放6个月或者在-20°C条件下存放1年
2：已开启试剂盒可在2-8°C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1×10^7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。

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

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。

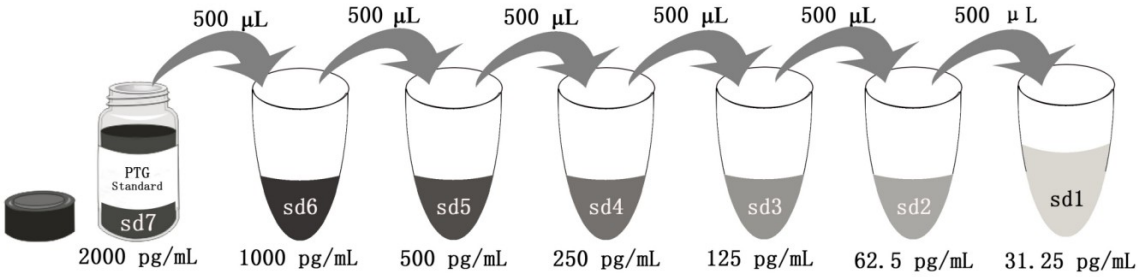
7.3 待检测样本：

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1:20或1:40稀释；细胞裂解液样本1:2或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。

7.4 梯度稀释的标准品：

检测血清和血浆样本，用2 mL PT 4B1样本稀释液复溶标准品；检测细胞裂解液样本，用2 mL PT 1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 1	**2000 µL**	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
	"sd7"	"sd6"	"sd5"	"sd4"	"sd3"	"sd2"	"sd1"

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

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。

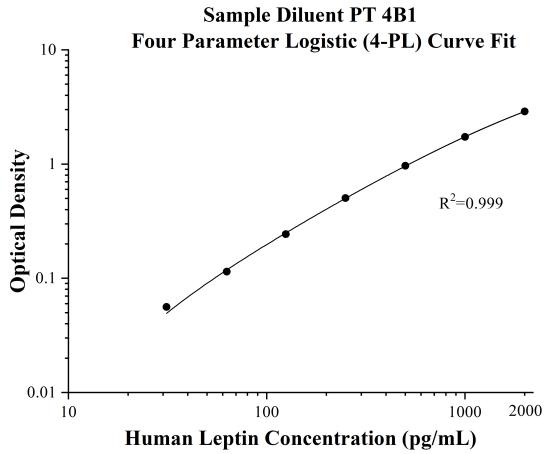
操作流程如下：

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				

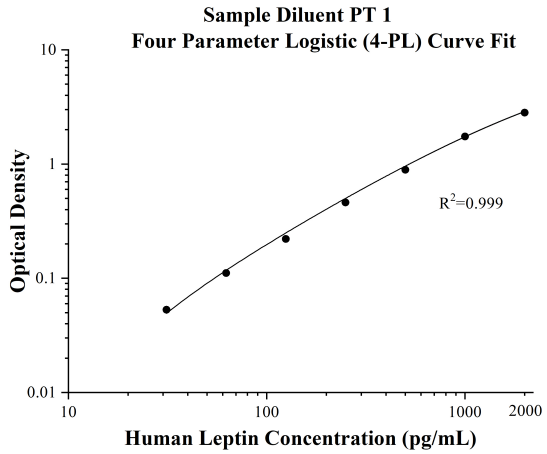
USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

九：实验参数

9.1 参考标曲图



(pg/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.041 0.031	0.036	-
31.25	0.093 0.092	0.092	0.056
62.5	0.152 0.149	0.15	0.114
125	0.277 0.281	0.279	0.243
250	0.54 0.538	0.539	0.503
500	1.002 1.002	1.002	0.966
1000	1.761 1.768	1.765	1.729
2000	2.914 2.929	2.921	2.885



(pg/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.032 0.034	0.033	-
31.25	0.085 0.088	0.086	0.053
62.5	0.144 0.144	0.144	0.111
125	0.253 0.255	0.254	0.221
250	0.496 0.49	0.493	0.46
500	0.919 0.932	0.925	0.892
1000	1.783 1.77	1.776	1.744
2000	2.84 2.862	2.851	2.818

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 (pg/mL)	标准差	变异系数CV%
1	8	776.7	15.5	2.0
2	8	427.7	7.6	1.8
3	8	198.9	7.3	3.7

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	16	781.9	17.6	2.3
2	16	426.8	6.7	1.6
3	16	201.0	6.8	3.4

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

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	平均值 (%)	范围 (%)
人血清	1:80	101	94-107
	1:160	104	101-108
细胞裂解液	1:16	97	94-99

9.4 样本值

人血清 - 应用本试剂盒，检测人血清样本中Leptin的浓度。

样本类型	均值 (pg/mL)	范围 (pg/mL)
人血清样本 (n=16)	15153.1	1377.0-48660.8

细胞裂解液

	Leptin (pg/mL)	总蛋白量 (**mg/mL**)
3T3-L1细胞裂解液	2972.8	2.7

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0.1 pg/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10倍。）

		人血清 (样本稀释液 PT 4B1)	细胞裂解液 (样本稀释液 PT 1)
1:2	均值（%）	100	100
	范围（%）	-	-
1:4	均值（%）	106	118
	范围（%）	99-117	117-119
1:8	均值（%）	108	109
	范围（%）	98-118	103-115
1:16	均值（%）	107	103
	范围（%）	94-119	83-124

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人Leptin，加入50 ng/mL以下细胞因子，无明显交叉反应。

Human:

CNTF

EGF

EPO

FGF-5

LIF

MCP-1/CCL2

MIP-1α/CCL3

MIP-1β/CCL4

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.

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com