Speedy™ 小鼠Adiponectin一步法ELISA检测试剂盒

请在实验前仔细阅读本说明书

产品货号： SE60003

规 格： 96T

灵敏度： 1.4 pg/mL

检测范围: 15.6-1000 pg/mL

用 途： 此试剂盒用于定量检测血清、血浆、细胞上清以及组织匀浆中小鼠Adiponectin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

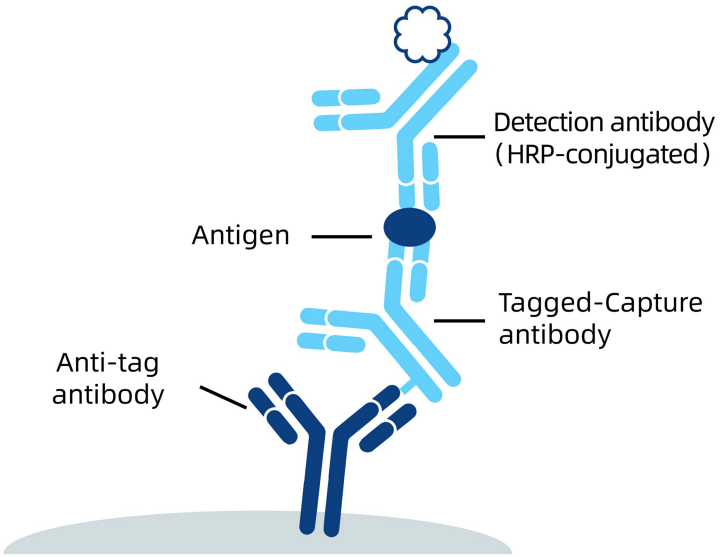
一：背景信息 3
二：检测原理 3
三：需自备的实验器材 3
四：试剂盒组分及储存 4
五：实验注意事项 4
六：样本准备 4
七：试剂准备 5
八：实验步骤 6
九：实验参数 7
9.1 参考标曲图 7
9.2 精密度 8
9.3 加标回收率 8
9.4 样本值 8
9.5 灵敏度 8
9.6 线性 9
9.7 特异性 9
十：参考文献 9

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

一：背景信息

脂联素（adiponectin）是一种由脂肪细胞分泌的脂肪衍生激素，在血清中高浓度，可增加胰岛素敏感性。脂联素对许多代谢过程具有调节作用，包括葡萄糖调节和脂肪酸氧化。脂联素的主要生理功能是增加胰岛素敏感性，降低与胰岛素抵抗相关的血浆浓度。肥胖患者血清中的脂肪脂联素浓度会降低，这与其他脂肪细胞因子相反。最近的研究发现，根据肥胖、胰岛素抵抗、糖尿病和心血管疾病的严重程度，患者血清中的脂肪脂联素水平会逐渐降低。低血清脂肪脂联素水平可能是 2 型糖尿病（T2DM）和其他心血管疾病的预测因素。

二：检测原理



抗标签抗体预先包被于板孔，可结合带标签的捕获抗体。抗原或样本、捕获抗体及辣根过氧化物酶（HRP）标记的检测抗体加入后，在溶液中形成夹心复合物。在HRP催化下，四甲基联苯胺（TMB）使底物溶液由无色变蓝，加入终止液后变黄。溶液颜色深浅与结合蛋白量成正比。测量波长为450 nm，校正波长为630 nm。

三：需自备的实验器材

3.1 酶标仪（可读取450nm和630nm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，也可使用Proteintech 公司数据分析网站：https: //www.ptgcn.com/products/elisa-kits/；

3.8 微孔板恒温振荡器。

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 *	2000 pg/瓶	2 瓶
Capture antibody (100×)	捕获抗体浓缩液（100×） **	60 uL/管	1 管
Detection antibody, HRP-Conjugated (100×)	HRP 标记检测抗体浓缩液 （100×） **	60 uL/管	1 管
Sample Diluent PT 4B1	样本稀释液 PT 4B1	30 mL/瓶	2 瓶
Detection Diluent	抗体稀释液	15 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
储存条件： 1：未开封试剂盒应于2–8°C或–20°C保存，有效期以试剂盒标签标注为准。 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，详见7.4部分，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 组织匀浆：使用预冷的1×PBS清洗组织去除多余的血液，用剪刀剪碎至1-2 mm，加入5-10 mL PBS至组织中进行匀浆处理，-80°C条件下冻存5 min，经过两个冻融周期后破坏细胞膜，5000×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×）的配制：

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1×洗涤液。

7.2 抗体混合液（1×）的配制：

开盖前瞬时离心，将捕获抗体和检测抗体稀释分别按1:100比例稀释到到同一管稀释液中，配制成检测所需的工作液。例如：将50 uL包被抗体浓缩液（100×）和50 uL检测抗体浓缩液（100×）加入 4900 uL抗体稀释液，混匀配制成1×抗体混合液。

7.3 待检测样本：

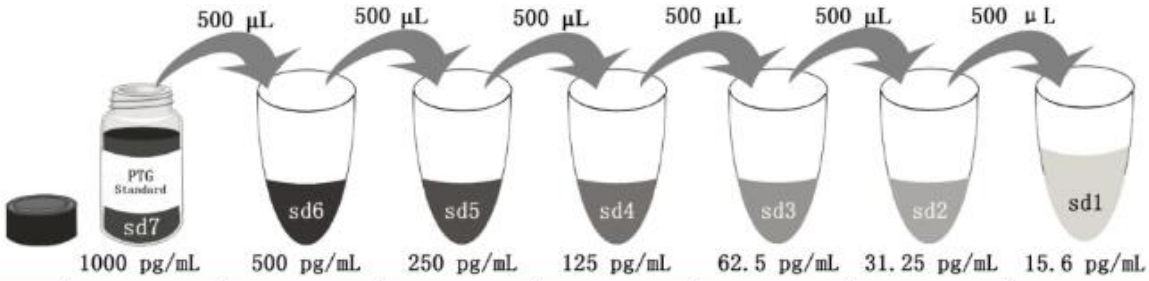
不同的样本使用相应的样本稀释液进行稀释，样本最低稀释比为1:2，即每个样本孔中最多加入样本原液25 uL。

如果样本检测值超过标曲最高范围，可将样本进一步稀释后再进行实验，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：小鼠血清和血浆样本1:40000或1:80000稀释； 细胞上清样本1:2或1:4稀释；组织匀浆样本1:200或1:400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：

使用2mL PT 4B1 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	**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20-30 min（捕获抗体浓缩液和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50 µL，余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本50 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 每孔加50 µL 抗体混合液（1×）(参照试剂准备部分7.2)，盖上封板膜，恒温振荡器上37°C 400 rpm 孵育 1 h（若无恒温振荡器，此步骤建议37°C静置孵育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；

8.5 显色：每孔加TMB显色液100 µL，恒温振荡器上37°C 400 rpm 孵育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）；

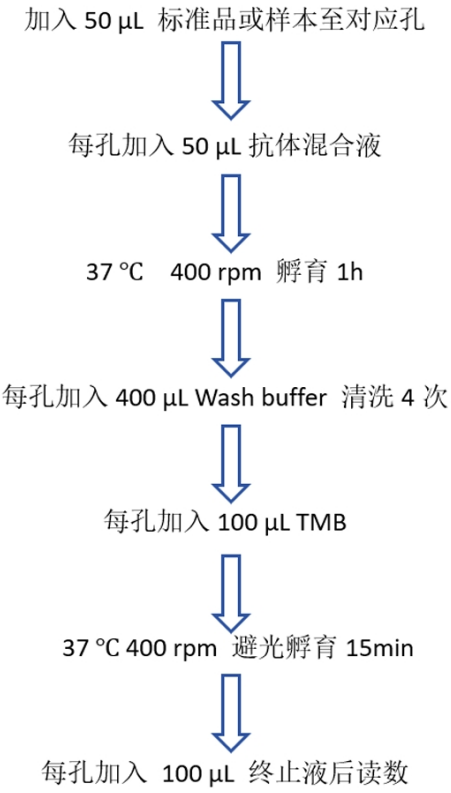
8.6 终止：每孔加终止液100 µL，蓝色变黄色。终止液与TMB显色液的加样顺序一致；（注意：眼睛和皮肤避免 接触终止液）

8.7 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；

8.8 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。

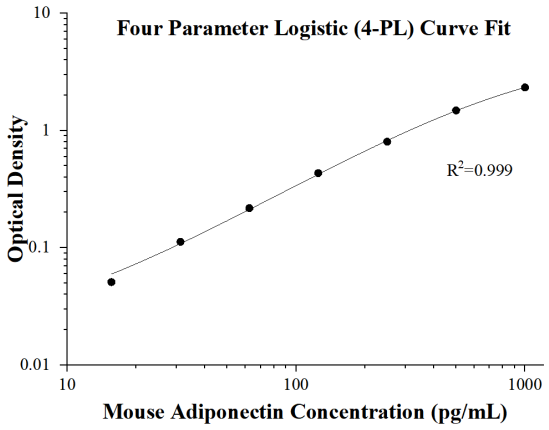
USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

操作流程如下：



九：实验参数

9.1 参考标曲图



(pg/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.0735 0.077	0.07525	-
15.6	0.1223 0.1301	0.1262	0.05095
31.25	0.1856 0.1899	0.18775	0.1125
62.5	0.2906 0.295	0.2928	0.21755
125	0.5094 0.507	0.5082	0.43295
250	0.8765 0.88	0.87825	0.803
500	1.5594 1.5611	1.56025	1.485
1000	2.4155 2.3946	2.40505	2.3298

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

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	477.3	14.4	3.0
2	8	125.0	4.5	3.6
3	8	63.0	2.1	3.3

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	495.4	24.9	5.0
2	16	127.8	6.3	4.9
3	16	64.1	3.1	4.8

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，进行小鼠Adiponectin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 (%)
小鼠血清	1:100000	103	97-108
	1:200000	99	96-104
细胞上清	1:8	113	103-123
	1:16	102	96-112
组织匀浆	1:400	93	84-101
	1:800	90	87-92

9.4 样本值

小鼠血清 - 应用本试剂盒，检测小鼠血清样本中小鼠Adiponectin的浓度。

样本类型	平均值 (μg/mL)	范围 (μg/mL)
小鼠血清 (n=16)	14.1	5.7-24.6

细胞上清 - 小鼠肺（一个肺，1-2 mm小块）在含有15%胎牛血清的RPMI-1640培养基中培养。收集细胞上清，检测小鼠Adiponectin的浓度为693.2 pg/mL。

组织匀浆 - 用PBS冲洗小鼠的肝脏以去除多余的血液，切成1-2 mm的小块，放入装有5-10 mL PBS的组织匀浆器中进行匀浆， 并在≤-80°C下储存5 min。在进行2次冻融循环以破坏细胞膜后，将匀浆液以5000 x g 离心 5 min以去除杂质。检测来自肝脏组织的匀浆液中小鼠Adiponectin的浓度为49.4 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，此试剂盒中小鼠Adiponectin的灵敏度为1.4 pg/mL。

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

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：

（小鼠血清样本预先稀释20000倍，组织匀浆样本预先稀释100倍。）

		小鼠血清	细胞上清	组织匀浆
1:2	均值 (%)	100	100	100
	范围 (%)	-	-	-
1:4	均值 (%)	101	108	102
	范围 (%)	99-103	103-112	102-103
1:8	均值 (%)	101	116	104
	范围 (%)	100-102	108-124	103-105
1:16	均值 (%)	105	122	105
	范围 (%)	103-108	118-126	99-111

9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组小鼠Adiponectin

加入50 ng/mL以下类似物或干扰物，无明显交叉反应

Mouse：

TNF-α

CD30 Ligand

Fas Ligand

OX40 Ligand

加入50 ng/mL以下类似物或干扰物，有交叉反应

Mouse：

CD40 Ligand　交叉反应约为0.04%

十：参考文献

1. Wang ZV. et al. (2016) J Mol Cell Biol. 8(2):93-100.

2. Liu M. et al. (2014) Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.28(1):25-31.

3. Díez JJ. et al. (2003) Eur J Endocrinol.148(3):293-300.

4. Yamauchi T. et al. (2003) Nature.423(6941):762-9.

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