

## 人内脏脂肪素酶联免疫吸附测定试剂盒

产品编号: **MA1002** 规格: **96 次**

### 产品内容

| 产品组成                 | 体积/数量            |
|----------------------|------------------|
| 人 Visfatin 预包被板      | 8 孔条×12 个        |
| 样品稀释液                | 30 mL            |
| 重组人 Visfatin 标准品(冻干) | 2 支(50 ng/支)     |
| 生物素标记人 Visfatin 抗体   | 130 μL(效价 1:100) |
| 抗体稀释液                | 12 mL            |
| 酶复合物(HRP 标记的链霉亲和素)   | 130 μL(效价 1:100) |
| 酶复合物稀释液              | 12 mL            |
| 浓缩洗涤液(25×)           | 30 mL            |
| 显色剂 TMB              | 10 mL            |
| 终止液                  | 10 mL            |
| 封板胶纸                 | 4 张              |

### 产品简介

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法,用于检测样品中人 Visfatin 的浓度。人 Visfatin 捕获抗体已经预包被于酶标板上,当加入样品或标准品时,其中的人 Visfatin 会与捕获抗体结合,而其它游离成分则会通过洗涤被除去。接着,再加入生物素标记的人 Visfatin 抗体后,抗人 Visfatin 抗体与人 Visfatin 接合,形成夹心的免疫复合物,其它游离成分则通过洗涤被除去。随后加入酶复合物,生物素与酶复合物特异性结合,这样酶复合物上的 HRP 就与夹心的免疫复合物连接起来,而其它游离成分则通过洗涤被除去。最后加入显色剂,若样品中存在人 Visfatin,则会形成免疫复合物,其上连接的 HRP 会催化无色的显色剂氧化生成蓝色物质,而后加入终止液,最终产物呈黄色。通过酶标仪检测,读取 450 nm 处的 OD 值,人 Visfatin 浓度与 OD450 值之间呈正比,通过检测标准品绘制标准曲线,对照未知样品中 OD 值,即可计算出样品中人 Visfatin 的浓度。

前 B 细胞集落增强因子 (Pre-B Cell Colony-Enhancing Factor, 简称 PBEF), 又称为内脏脂肪素 (Visfatin), Visfatin 是一种多功能蛋白,参与调节多种代谢过程。它在细胞内作为烟酰胺磷酸核糖转移酶 (Nampt) 发挥作用,是 NAD<sup>+</sup> 合成的关键酶,调节细胞的能量代谢。

在胰岛 β 细胞中, Visfatin 通过调节 NAD<sup>+</sup> 的合成,影响胰岛素的分泌,从而在血糖调节中发挥重要作用。Visfatin 由脂肪细胞、巨噬细胞和炎症内皮组织分泌,与肥胖和炎症相关。它在炎症反应中通过激活 PI3K/Akt 和 MAPK/ERK1/2 信号通路,促进细胞增殖和炎症因子的分泌。Visfatin 在多种癌症中表达上调,与肿瘤细胞的增殖、血管生成、转移和药物耐受性相关。例如,在乳腺癌中, Visfatin 通过激活 PI3K/Akt 信号通路,促进肿瘤细胞的增殖。在内皮细胞中, Visfatin 通过 mTOR 信号通路促进血管生成。



## 产品参数:

|      |                       |
|------|-----------------------|
| 检测范围 | 0.78 ng/mL~50 ng/mL   |
| 敏感性  | 150 pg/mL             |
| 特异性  | 系统和其它因子无交叉反应          |
| 样本类型 | 人血清、血浆、体液、组织匀浆或细胞培养上清 |

## 使用方法

### (一) 样品制备

1.根据样品种类选择相应的处理方法:

(1) 细胞上清: 将细胞培养上清液100~500×g离心5min, 去除悬浮物后即可。

(2) 血清样品: 将全血在室温下静置0.5~2h, 待其自然凝固并析出血清后, 离心取黄色上清即可(4℃, 1,000~2,000×g, 10min), 注意请勿吸取沉淀, 制备好的血清需置于冰上待用, 请勿在其中添加任何防腐剂或抗凝剂;

(3) 血浆样品: 使用EDTA对全血进行抗凝处理后, 混合均匀置于冰上, 离心取黄色上清即可(4℃, 1,000~2,000×g, 10min), 注意请勿吸取沉淀, 制备好的血浆需置于冰上待用;

(4) 组织匀浆/体液: 离心去除沉淀即可。

**注意:**

①若待测样品无法及时检测, 样品制备完成后, 请分装冻存于-20℃, 避免反复冻融;

②请保证待测样品清澈透明, 检测前如发现样品中有悬浮物, 需通过离心去除;

③为了保证检测结果准确, 请勿使用溶血、黄疸、高血脂或污染的样品。

### 2.稀释样品

查阅相关文献, 预估样品中待测因子的含量, 从而确定适当的稀释倍数, 使稀释后样品中待测因子的浓度处于ELISA试剂盒的最佳检测范围。根据待测因子含量的不同, 分别采取不同的稀释方案:

(1) 待测因子含量在 500~5,000 ng/mL 范围内, 一般按 1:100 稀释, 即向 297 μL 样品稀释液中加入 3 μL 样品;

(2) 待测因子含量在 50~500 ng/mL 范围内, 一般按 1:10 稀释, 即向 225 μL 样品稀释液中加入25 μL 样品;

(3) 待测因子含量在 0.78~50 ng/mL 范围内, 一般按 1:2 稀释, 即向 100 μL 样品稀释液中加入 100 μL 样品;

(4) 待测因子含量≤0.78 ng/mL, 样品一般无需稀释。

以上方案仅供参考, 实验中请详细记录样品的稀释方法。

### (二) 检测准备工作

3.试剂盒自4℃冰箱取出后, 请置于室温平衡20min; 如从-20℃取出, 各组分需彻底融化后再平衡20min; 检测完成后, 剩余试剂请及时置于4℃或-20℃保存。



4.将浓缩洗涤液(25×)用双蒸水或去离子水稀释成1×洗涤液。

5.重组人 Visfatin 标准品的稀释和使用(在使用前2h内准备, 室温操作, 请严格控制在 25~28℃)

(1) 配制 50 ng/mL 标准品: 取 1 mL 样品稀释液加入标准品管内, 盖好后静置 15 min 以上, 然后反复颠倒 / 搓动以助溶解;

(2) 按下表将 50 ng/mL 标准品用样品稀释液进行倍比梯度稀释。(最高浓度为 50 ng/mL, 将标准品稀释液作为浓度 0 ng/mL。)

| 管号 | 稀释液用量(μL) | 复溶后标准品用量(μL) | 标准品的最终浓度(ng/mL) |
|----|-----------|--------------|-----------------|
| A  | 0         | 1000         | 50              |
| B  | 300       | 300(从A管取出)   | 25              |
| C  | 300       | 300(从B管取出)   | 12.5            |
| D  | 300       | 300(从C管取出)   | 6.25            |
| E  | 300       | 300(从D管取出)   | 3.12            |
| F  | 300       | 300(从E管取出)   | 1.56            |
| G  | 300       | 300(从F管取出)   | 0.78            |
| H  | 300       | 0            | 0               |

注意: 标准品复溶加样后, 剩余部分请丢弃。

6.准备生物素标记人 Visfatin 抗体工作液 ( 需在使用前 1 h 内准备 )

(1) 按每孔需添加100μL抗体工作液, 计算其总用量(为弥补操作中的损耗, 需多配制 100~200μL);

(2) 按1μL生物素标记人 Visfatin 抗体添加99μL抗体稀释液的比例配制工作液, 轻轻混匀。

7. 准备酶复合物工作液 ( 需在使用前 1 h 内准备 )

(1) 按每孔需添加 100 μL 酶复合物工作液, 计算其总用量 ( 为弥补操作中的损耗, 需多配制100~200 μL );

(2) 按 1 μL 酶复合物 添加 99 μL 酶复合物稀释液 的比例配制工作液, 轻轻混匀。

### (三) 检测流程

8.通过计算确定一次实验所需的板条数, 取出所需板条放置于框架内, 多余的板条请放回铝箔袋密封, 保存于4℃或-20℃。

注意:

①标准品和样品建议做双复孔检测;

②每次实验均需绘制标准曲线。

9.将用样品稀释液稀释后的样品和不同浓度标准品(100μL/孔)分别加入相应孔中, 用封板胶纸封住反应孔, 37℃孵育90min。

注意:

①请查阅相关文献确定样品中待检测蛋白的大致浓度, 若其大于本试剂盒标准曲线的最大标准品浓度, 请将样品适当稀释后再进行检测;

②整个加样过程不宜超过10min, 否则可能会影响检测结果。

10.甩去酶标板内液体, 无需洗板, 将板倒扣在吸水纸上拍干。

11.加入稀释后的生物素标记人 Visfatin 抗体工作液(100μL/孔), 用封板胶纸封住反应孔, 37℃孵育60min。



12.洗板5次，每孔1×洗涤液用量为300μL，注入与吸出间隔15~30s，洗完后将板倒扣在吸水纸上拍干。

**注意：**洗涤过程至关重要，洗涤不充分会导致结果产生较大误差。

13.加入稀释后的酶复合物 (100 μL/孔)，用封板胶纸封住反应孔，37℃避光孵育 30 min；

14.洗板 5 次，方法同步步骤 12；

15.加入显色剂 TMB(100 μL/孔)，用封板胶纸封住反应孔，37℃避光孵育30min。

**注意：**

① 在保存和使用时，请勿将 TMB 接触氧化剂和金属；

② 因实验室条件差异，最佳显色时间会有所不同，反应充分时肉眼可见标准品的前 3~4 孔有明显的梯度蓝色。

16.加入终止液(100μL/孔)，混匀后即刻使用酶标仪测量OD450，同时设定540nm或570nm作为校正波长，即可计算得到校正吸光度值(OD450-OD540或OD450-OD570)；

**注意：**读取OD值建议在10min内完成。

#### (四) 数据分析

17.绘制标准曲线。以标准品浓度作横坐标，OD值作纵坐标，利用计算机软件作四参数逻辑(4-PL)曲线拟合创建标准曲线，通过样品的OD值即可在标准曲线上计算出其相应浓度。

**注意：**

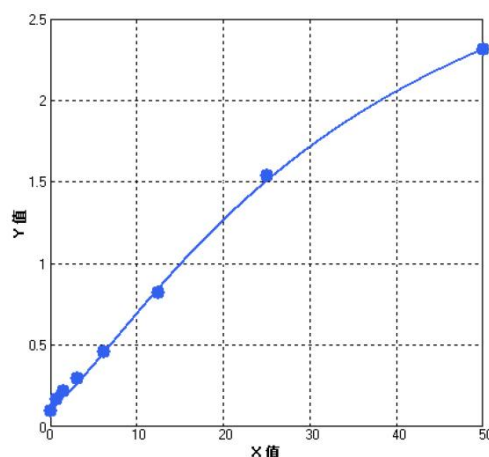
①复孔OD值在20%的差异范围内结果才有效，复孔OD值取平均后可作为测量值；

②若样品OD值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测，计算浓度时应乘以稀释倍数。

#### 标准曲线范例

人 Visfatin 参考标准曲线

| 标准品浓度      | O.D.  |
|------------|-------|
| 0 ng/mL    | 0.095 |
| 0.78 ng/mL | 0.164 |
| 1.56 ng/mL | 0.216 |
| 3.12 ng/mL | 0.297 |
| 6.25 ng/mL | 0.459 |
| 12.5 ng/mL | 0.820 |
| 25 ng/mL   | 1.537 |
| 50 ng/mL   | 2.311 |



**注意：**本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线计算样品含量。

#### 保存条件

2~8℃保存，自生产之日起6个月有效；长期储存请置于-20℃，自生产之日起12个月有效。

#### 注意事项

1.浓缩洗涤液低温情况下可能会出现结晶，请水浴加热使结晶完全溶解后再配制工作液；



2. 严禁混用不同批号试剂盒的组分；
3. 加样过程请避免产生气泡，实验操作过程中一定要保证试剂充分混匀，否则会使结果产生较大误差；
4. 说明书中提到的室温条件，请严格控制在**25~28℃**；
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；
6. 本产品仅限科研使用。

S250302

