

## 人内皮抑素酶联免疫吸附测定试剂盒

产品编号：MA1114 规格：96 次

### 产品内容

产品组成	体积/数量
人 Endostatin 预包被板	8 孔条×12 个
样品稀释液	30 mL
重组人 Endostatin 标准品(冻干)	2 支(50 ng/支)
生物素标记人 Endostatin 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 Endostatin 的浓度。人 Endostatin 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 Endostatin 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 Endostatin 抗体后，抗人 Endostatin 抗体与人 Endostatin 结合，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 Endostatin，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 Endostatin 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 Endostatin 的浓度。

内皮抑素（Endostatin）是胶原蛋白 XVIII 羧基端经蛋白酶水解后产生的内源性血管生成抑制因子，分子量约 20 kDa。它主要通过结合内皮细胞表面的整合素、生长因子受体等分子，特异性抑制血管内皮细胞的增殖、迁移与管腔形成，从而阻断新生血管生成，减少组织与肿瘤的血供。作为一种广谱、低毒的抗血管生成物质，内皮抑素在肿瘤生长与转移、眼部新生血管疾病、炎症及纤维化等病理过程中发挥重要调控作用，是抗血管生成治疗与相关疾病机制研究中的重要靶点分子。



## 产品参数：

检测范围	0.156 ng/mL~10 ng/mL
敏感性	0.06 ng/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 100~1,000 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 10~100 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 0.156~10 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≤0.156 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 Endostatin 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) 配制 10 ng/mL 标准品: 取 200 μL 50 ng/mL 的标准品加入有 800 μL 样品稀释液的 EP 管中, 混匀, 做上标记;

(3) 按下表将 10 ng/mL 标准品用样品稀释液进行倍比梯度稀释。(最高浓度为 10 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	10
B	300	300(从A管取出)	5
C	300	300(从B管取出)	2.5
D	300	300(从C管取出)	1.25
E	300	300(从D管取出)	0.625
F	300	300(从E管取出)	0.312
G	300	300(从F管取出)	0.156
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 Endostatin 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 Endostatin 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 Endostatin 抗体工作液(100 $\mu$ L/孔)，用封板胶纸封住反应孔，37 $^{\circ}$ C 孵育60min。
12. 洗板5次，每孔1 $\times$ 洗涤液用量为300 $\mu$ L，注入与吸出间隔15~30s，洗完后将板倒扣在吸水纸上拍干。
13. 加入稀释后的酶复合物 (100  $\mu$  L/ 孔)，用封板胶纸封住反应孔，37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min；
14. 洗板 5 次，方法同步骤 12；
15. 加入显色剂 TMB(100  $\mu$  L/ 孔 )，用封板胶纸封住反应孔，避光 37 $^{\circ}$ C 反应 10~25 min。

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(100 $\mu$ L/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。

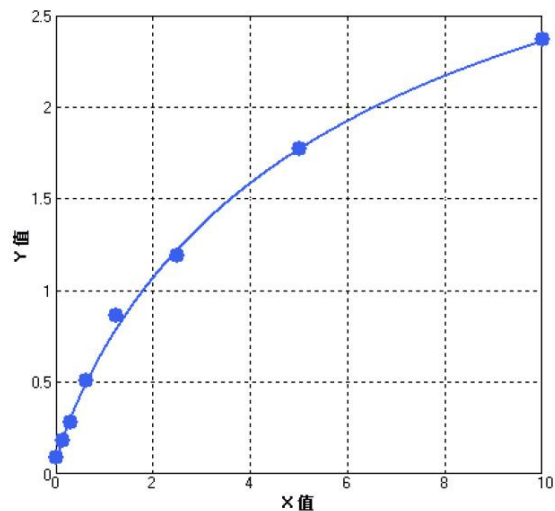
注意：

- 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 Endostatin 参考标准曲线

标准品浓度	O.D.
0 ng/mL	0.091
0.156 ng/mL	0.178
0.312 ng/mL	0.283
0.625 ng/mL	0.509
1.25 ng/mL	0.863
2.5 ng/mL	1.191
5 ng/mL	1.769
10 ng/mL	2.366



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。

S260301

