

人 Dickkopf 相关蛋白 4 酶联免疫吸附测定试剂盒

产品编号: MA1138 规格: 96 次

产品内容

产品组成	体积/数量
人 DKK4 预包被板	8 孔条×12 个
样品稀释液	30 mL
重组人 DKK4 标准品(冻干)	2 支(10 ng/支)
生物素标记人 DKK4 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 DKK4 的浓度。人 DKK4 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 DKK4 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 DKK4 抗体后,抗人 DKK4 抗体与人 DKK4 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 DKK4,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 DKK4 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 DKK4 的浓度。

DKK4 (Dickkopf 相关蛋白 4) 是 Dickkopf 蛋白家族成员之一,属于分泌型糖蛋白,通过抑制 Wnt/β-catenin 信号通路参与调控胚胎发育、细胞增殖与分化。该蛋白在多种组织中表达,与肿瘤发生、骨骼发育及神经系统功能密切相关,是潜在的癌症治疗靶点和生物标志物。

产品参数:

检测范围	31.25 pg/mL~2,000 pg/mL
敏感性	5 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 $100\sim 500\times g$ 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 $0.5\sim 2\text{h}$, 待其自然凝固并析出血清后, 离心取黄色上清即可 (4°C , $1,000\sim 2,000\times g$, 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°C , $1,000\sim 2,000\times g$, 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°C , 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 $20\sim 200\text{ ng/mL}$ 范围内, 一般按 $1:100$ 稀释, 即向 $297\text{ }\mu\text{L}$ 样品稀释液中加入 $3\text{ }\mu\text{L}$ 样品;

(2) 待测因子含量在 $2\sim 20\text{ ng/mL}$ 范围内, 一般按 $1:10$ 稀释, 即向 $225\text{ }\mu\text{L}$ 样品稀释液中加入 $25\text{ }\mu\text{L}$ 样品;

(3) 待测因子含量在 $31.25\sim 2,000\text{ pg/mL}$ 范围内, 一般按 $1:2$ 稀释, 即向 $100\text{ }\mu\text{L}$ 样品稀释液中加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 样品;

(4) 待测因子含量 $\leq 31.25\text{ pg/mL}$, 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°C 冰箱取出后, 请置于室温平衡 20min ; 如从 -20°C 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°C 或 -20°C 保存。

4. 将浓缩洗涤液 ($25\times$) 用双蒸水或去离子水稀释成 $1\times$ 洗涤液。

5. 重组人 DKK4 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 $25\sim 28^{\circ}\text{C}$)

(1) 配制 10 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 $2,000\text{ pg/mL}$ 标准品: 取 $200\text{ }\mu\text{L}$ 10 ng/mL 的标准品加入有 $800\text{ }\mu\text{L}$ 样品稀释液的 EP 管中, 混匀, 做上标记;



(3) 按下表将 2,000 pg/mL 标准品用样品稀释液进行倍比梯度稀释。(最高浓度为 2,000 pg/mL, 将标准品稀释液作为浓度 0 pg/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(pg/mL)
A	0	1000	2,000
B	300	300(从A管取出)	1,000
C	300	300(从B管取出)	500
D	300	300(从C管取出)	250
E	300	300(从D管取出)	125
F	300	300(从E管取出)	62.5
G	300	300(从F管取出)	31.25
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 DKK4 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 DKK4 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 DKK4 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，方法同步骤 12；



15.加入显色剂 TMB(100 μ L/孔),用封板胶纸封住反应孔,避光 37℃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 μ 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。

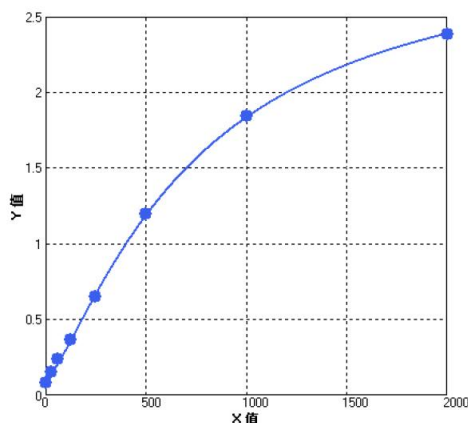
注意:

- 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 DKK4 参考标准曲线

标准品浓度	O.D.
0 pg/mL	0.082
31.25 pg/mL	0.153
62.5 pg/mL	0.236
125 pg/mL	0.365
250 pg/mL	0.651
500 pg/mL	1.198
1,000 pg/mL	1.844
2,000 pg/mL	2.386



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。

S260801

