

小鼠瘦素受体酶联免疫吸附测定试剂盒

Mouse Leptin R ELISA Kit

本产品需冰袋运输。保存于4℃，保质期6个月；保存于-20℃，保质期12个月。

产品参数

货号	HJ474
规格	96次
检测范围	0.313 ng/mL~20 ng/mL
敏感性	32 pg/mL
特异性	系统和其它因子无交叉反应
样本类型	小鼠血清、血浆、体液、组织匀浆或细胞培养上清

产品简介

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法检测样品中小鼠 Leptin R 的浓度。小鼠 Leptin R 捕获抗体已经预包被于酶标板上，当加入样品或标准品时，其中的小鼠 Leptin R 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小鼠 Leptin R 抗体后，抗小鼠 Leptin R 抗体与小鼠 Leptin R 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，若样品中存在小鼠 Leptin R，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，小鼠 Leptin R 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，即可计算出样品中小鼠 Leptin R 的浓度。

背景简介

瘦素受体 (Leptin R), 也称 CD295, 由 LEPR 基因编码, 位于人类第 1 染色体的 1p31.3 位置, 是一种含有 1165 个氨基酸的糖蛋白, 属于 I 类细胞因子受体超家族, 其胞外结构域有 6 个纤维连接蛋白 III 型重复序列及多个 N 糖基化位点, 可与脂肪细胞分泌的瘦素结合, 通过激活 JAK-STAT 等信号通路影响相关基因表达, 进而调节能量代谢、生殖功能并参与免疫调节。

在疾病方面, 肥胖个体瘦素水平升高, 但常因瘦素受体功能异常等出现瘦素抵抗, 使瘦素难以发挥抑制食欲等作用; 其与糖尿病关系密切, 瘦素受体异常可致胰岛素抵抗等影响血糖代谢, 且 LEPR 基因多态性会增加糖尿病风险, 还与高血压、冠心病等心血管疾病及多囊卵巢综合征、非酒精性脂肪性肝炎、某些癌症等的发生发展相关。



产品内容

组分	体积或数量
小鼠Leptin R预包被板	8孔条×12个
样品稀释液	30 mL
重组小鼠Leptin R标准品(冻干)	2支(20 ng/支)
生物素标记小鼠Leptin R抗体	130 μ L(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 μ L(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

操作步骤

样品制备

1. 根据样品种类选择相应的处理方法：

- 细胞上清：**将细胞培养上清液100~500×g离心5 min，去除悬浮物后即可；
- 血清样品：**将全血在室温下静置0.5~2 h，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，10 min)，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；
- 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，10 min)，注意请勿吸取沉淀，制备好的血浆需置于冰上待用；
- 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：

- 待测因子含量在200~2,000 ng/mL范围内，一般按1:100稀释，即向297 μ L样品稀释液中加入3 μ L样品；
- 待测因子含量在20~200 ng/mL范围内，一般按1:10稀释，即向225 μ L样品稀释液中加入25 μ L样品；
- 待测因子含量在0.313~20 ng/mL范围内，一般按1:2稀释，即向100 μ L样品稀释液中加入100 μ L样品；
- 待测因子含量 $\leq$ 0.313 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。

检测准备工作

3. 试剂盒自 4℃冰箱取出后,请置于室温平衡 20 min; 如从 -20℃取出,各组分需彻底融化后再平衡 20 min; 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. 重组小鼠Leptin R标准品的稀释和使用(在使用前2 h内准备, 室温操作, 请严格控制在25~28℃)
- ① 配制 20 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 20 ng/mL 标准品用样品稀释液进行倍比梯度稀释。(最高浓度为 20 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	1,000	20
B	300	300(从A管中取)	10
C	300	300(从B管中取)	5
D	300	300(从C管中取)	2.5
E	300	300(从D管中取)	1.25
F	300	300(从E管中取)	0.625
G	300	300(从F管中取)	0.313
H	300	0	0

注意: 标准品复溶加样后, 剩余部分请丢弃。

6. 准备生物素标记小鼠 Leptin R 抗体工作液
- ① 按每孔需添加 100 μL 抗体工作液,计算其总用量 (为弥补操作中的损耗,需多配制 100~200 μL);
- ② 按 1 μL 生物素标记小鼠 Leptin R 抗体 添加 99 μL 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。

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 (100 μL/ 孔) 分别加入相应孔中,用封板胶纸封住反应孔,37℃孵育 90 min;
- 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 10 min,否则可能会影响检测结果。
- 10.用去酶板内液体,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小鼠 Leptin R 抗体工作液 (100 μL/ 孔),用封板胶纸封住反应孔,37℃孵育 60 min;

12. 洗板 5 次, 每孔 1× 洗涤液用量为 300 μ L, 注入与吸出间隔 15~30 s, 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 μ L/ 孔), 用封板胶纸封住反应孔, 37°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 μ L/ 孔), 用封板胶纸封住反应孔, 避光 37°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 μ L/ 孔), 混匀后即刻使用酶标仪测量 OD450, 同时设定 540 nm 或 570 nm 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 10 min 内完成。

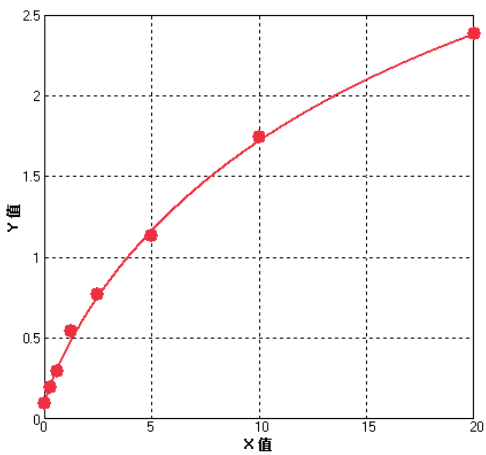
数据分析

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

小鼠Leptin R参考标准曲线

标准品浓度	O.D.
0 ng/mL	0.098
0.313 ng/mL	0.198
0.625 ng/mL	0.293
1.25 ng/mL	0.545
2.5 ng/mL	0.768
5 ng/mL	1.135
10 ng/mL	1.741
20 ng/mL	2.380



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。

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°C;
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。