

# 小鼠脂联素酶联免疫吸附测定试剂盒

Mouse Adiponectin/Acrp30 ELISA Kit

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

## 产品参数

|      |                         |
|------|-------------------------|
| 货号   | HJ517                   |
| 规格   | 96次                     |
| 检测范围 | 31.25 pg/mL~2,000 pg/mL |
| 敏感性  | 7 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 Adiponectin 的浓度。小鼠 Adiponectin 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 Adiponectin 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 Adiponectin 抗体后，抗小鼠 Adiponectin 抗体与小鼠 Adiponectin 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 Adiponectin，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 Adiponectin 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 Adiponectin 的浓度。

## 背景简介

脂联素 (Adiponectin)，也被称为 Acrp30，是一种由脂肪细胞分泌的脂肪因子 (adipokine)，在调节血糖水平、脂质代谢和胰岛素敏感性方面起着重要的生理作用。Adiponectin 通过其抗炎、抗纤维化和抗氧化作用，调节葡萄糖水平、脂质代谢和胰岛素敏感性。它通过两种 Adiponectin 受体 (AdipoR1 和 AdipoR2) 介导其代谢过程。Adiponectin 能够刺激葡萄糖利用和脂肪酸氧化，通过激活 AMPK 激活的蛋白激酶 (AMPK) 来实现。

Adiponectin 在多种疾病中扮演着重要角色，包括肥胖、糖尿病、心血管疾病和多种癌症。研究表明，Adiponectin 水平与癌症、心血管疾病和糖尿病呈负相关，并且适当的健康营养可以显著增加 Adiponectin 水平。Adiponectin 通过激活 AMPK 级联反应来刺激骨骼肌中的β - 氧化。在癌症方面，Adiponectin 可能通过直接或间接作用于 AdipoR1/2 来激活或抑制多种抗癌信号通路。



## 产品内容

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

## 操作步骤

### 样品制备

#### 1. 根据样品种类选择相应的处理方法：

- A. 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；
- B. 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°C, 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；
- C. 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, 1,000~2,000×g, 10 min)，注意请勿吸取沉淀，制备好的血浆需置于冰上待用；
- D. 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20~200 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2~20 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31.25~2,000 pg/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≤31.25 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。

## 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 20 min; 如从 -20°C 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°C 或 -20°C 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 Adiponectin 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°C**)
  - 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 配制 2,000 pg/mL 标准品: 取 100 μL 20 ng/mL 的标准品加入有 900 μL 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         | 1,000        | 2,000           |
| B  | 300       | 300(从 A 管中取) | 1,000           |
| C  | 300       | 300(从 B 管中取) | 500             |
| D  | 300       | 300(从 C 管中取) | 250             |
| E  | 300       | 300(从 D 管中取) | 125             |
| F  | 300       | 300(从 E 管中取) | 62.5            |
| G  | 300       | 300(从 F 管中取) | 31.25           |
| H  | 300       | 0            | 0               |

**注意:** 标准品复溶加样后, 剩余部分请丢弃。

6. 准备生物素标记小鼠 Adiponectin 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 Adiponectin 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°C 或 -20°C;  
**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°C 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. 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小鼠 Adiponectin 抗体工作液(100 μL/孔), 用封板胶纸封住反应孔, 37°C 孵育 60 min;

12. 洗板 5 次, 每孔 1× 洗涤液用量为 300  $\mu\text{L}$ , 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  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ), 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  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ), 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  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ), 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。

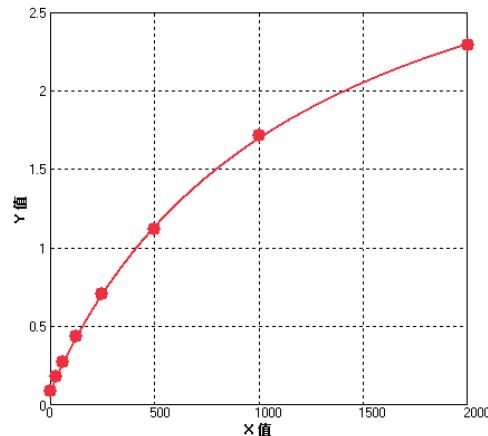
### 数据分析

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 Adiponectin 参考标准曲线

| 标准品浓度       | O.D.  |
|-------------|-------|
| 0 pg/mL     | 0.086 |
| 31.25 pg/mL | 0.182 |
| 62.5 pg/mL  | 0.276 |
| 125 pg/mL   | 0.440 |
| 250 pg/mL   | 0.709 |
| 500 pg/mL   | 1.118 |
| 1,000 pg/mL | 1.719 |
| 2,000 pg/mL | 2.294 |



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。

