

Human Leptin ELISA Kit

产品编号	产品名称	包装
PL700	Human Leptin ELISA Kit	96次

产品简介:

- 碧云天的Human Leptin ELISA Kit (Human Leptin Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay Kit), 即人瘦素酶联免疫吸附检测试剂盒, 是一种用于特异性地高灵敏地定量检测人血清、血浆或细胞培养上清液中的Leptin的ELISA试剂盒。
- 本产品检测灵敏度高, 特异性强, 重复性好。多次重复检测结果表明, 最小检出量为26.6pg/ml, 与小鼠Leptin和大鼠Leptin等均没有交叉反应, 板内、板间变异系数均小于10%。
- 人瘦素蛋白(Leptin)是一种分子量为16kDa, 长度为146个氨基酸的非糖基化多肽, 主要参与调节脂肪组织体积和能量平衡。在人和小鼠体内, 瘦素基因(OB)的失活突变会导致肥胖的发生。成熟的人Leptin与小鼠及大鼠Leptin分别具有87%和84%的氨基酸同源性。体内唯一能够产生Leptin的细胞是脂肪细胞, Leptin的产生受到激素、细胞因子和营养物质的影响。例如胰岛素和糖皮质激素会增强Leptin的表达, 然而儿茶酚胺会抑制Leptin的表达。Leptin通常以游离形式存在于血浆中, 能够穿过血脑屏障, 也能够随乳汁分泌出来。
- 人Leptin受体(ObR或LEPR)是一种分子量为150kDa, 长度为1144个氨基酸的I型跨膜糖蛋白, 属于I类细胞因子受体家族中IL-6受体家族。ObR经过酶切作用后会产生多种变体(ObRa、b、c、d), 每种变体具有不同长度的胞内段, 同时还包括游离形式的受体ObRe。ObRb, 具有完成胞内段, 主要表达在下丘脑弓状细胞核, 是信号传递的必需分子。ObRa表达较为广泛, 其与ObRc、ObRd一起被认为是具有调节Leptin结合和内存作用的受体, 却并不参与信号传递, 它们的胞内段与ObRb相比较短。当与Leptin二聚体结合后, ObRb二聚体会与ObRa、ObRc或ObRd之一形成四聚体复合物, 从而传递信号。ObRb的突变会产生肥胖表型的大鼠或小鼠, 小鼠的受体基因突变发生在胞质区, 而大鼠的基因突变则发生在受体的胞外域。Leptin会产生多种相反的程度依赖性作用, 例如Leptin能诱导神经元细胞表达POMC、从而减少食物摄取; 反之通过诱导NpY和AgRP的表达则会增加食物的摄取。
- Leptin本质上来讲是一种“饥饿信号”, Leptin浓度较低就会增强食欲减少能量消耗。在脂肪细胞体积增大时就会增加Leptin的分泌, 从而导致食欲降低, 能量消耗增多。然而, 肥胖人群通常会有“瘦素抵抗”现象出现, 这一部分是由于高浓度的甘油三酯造成的Leptin血-脑转运体的饱和, 另一部分是由于细胞对Leptin的响应降低所造成。还有很少一部分肥胖人群是由于遗传性的Leptin缺陷导致。Leptin缺陷同样会影响到免疫系统, 会降低Th1细胞的应答, 增加感染的发生几率。因节食等多种原因而过度消瘦所造成的Leptin缺陷同样也会对青春期发育产生影响。
- 瘦素受体与Leptin结合后通过招募JAK2使瘦素受体上的三个关键酪氨酸位点发生磷酸化, 磷酸化的Tyr位点能够招募STAT3并使之磷酸化激活, 随后发生二聚化进入细胞核发挥功能, 启动SOCS3和NpY等靶基因的表达; 另外, SOCS3蛋白又能抑制激活的JAK2-STAT3通路, 从而实现负反馈调节。
- 本试剂盒采用双抗体夹心ELISA法(Sandwich ELISA)检测样品中人Leptin的浓度, 其原理见图1。人Leptin特异的单克隆捕获抗体已预包被于酶标板上, 当加入标准品或样品时, 其中的人Leptin会与捕获抗体结合。当加入生物素化的抗人Leptin抗体后, 生物素化抗人Leptin抗体与人Leptin结合, 形成夹心的免疫复合物。随后加入辣根过氧化物酶标记Streptavidin (HRP-Streptavidin), 由于生物素与链霉亲和素(Streptavidin)可以特异性地结合, 因此链霉亲和素连接的HRP就会与夹心的免疫复合物连接起来而被固相捕获。最后加入显色剂TMB溶液, 固相捕获的辣根过氧化物酶就会催化无色的显色剂氧化成蓝色物质, 在加入终止液后呈黄色。通过酶标仪检测450nm处的吸光度值就能实现定量检测。人Leptin浓度与A450值呈正比, 通过绘制标准曲线, 对照样品吸光度值, 即可计算出样品中人Leptin浓度。

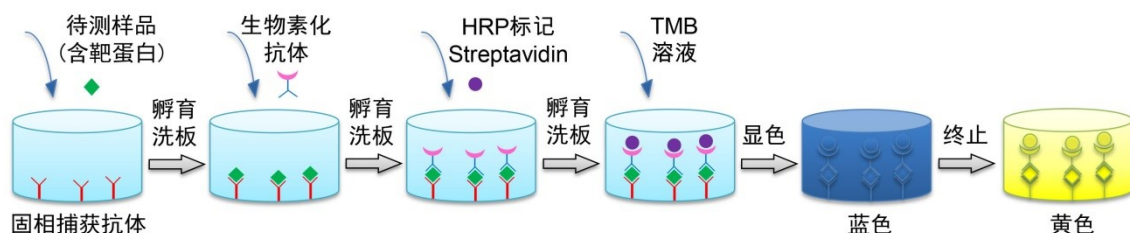


图1. 双抗体夹心ELISA原理图。

- 一个包装的本试剂盒, 包括标准品检测, 可以进行96次检测。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
------	------	----

PL700-1	人Leptin抗体预包被板	8孔×12条
PL700-2	样品分析缓冲液	5ml
PL700-3	标准品稀释液(5X)	10ml
PL700-4	人Leptin标准品	2-4瓶
PL700-5	人Leptin生物素化抗体	10ml
PL700-6	辣根过氧化物酶标记Streptavidin	10ml
PL700-7	洗涤液(20X)	30ml
PL700-8	TMB溶液	10ml
PL700-9	终止液	5ml
PL700-10	封板膜(透明)	2张
PL700-11	封板膜(白色)	2张
—	说明书	1份

保存条件：

标准品4℃保存，1-2周内有效，-20℃保存6个月内有效；试剂盒其它组分4℃保存6个月内有效。除标准品外，试剂盒其它组分严禁冻存。

注意事项：

- 由于标准品一般是冻干粉，在制备后需要严格校准，所以标准品的瓶数及每瓶标准品所需加入的稀释液体积请以实际收到的试剂盒及标准品标签上的标注为准。
- 洗涤液(20X)在低温下可能有结晶，如果发现结晶，请室温水浴加热使结晶完全溶解后再配制工作液。
- 为保证标准品的精确性，标准品配制使用后，如果有剩余请勿再次使用。
- TMB溶液请勿接触氧化剂和金属，否则容易失效。
- 加样时，请注意每个样品或标准品必须更换枪头，一方面避免交叉污染，另一方面也避免吸取体积的误差。
- 由于本试剂盒均经过独立测试，所以请勿混用不同货号 and 不同批次的试剂盒组分，即使是同种试剂盒不同批次的试剂盒组分也不能混用。多个试剂盒同时检测时，请独立使用各个试剂盒中的试剂，请勿使用不同试剂盒中相同名称的组分。
- 充分混匀对保证反应结果的精确性很重要，在加液后请轻轻晃动整个96孔板，以保证混匀。
- 本试剂盒很多操作在室温进行，要求严格控制室温在25-28℃。温度低于25℃会导致最终检测到的吸光度显著下降。
- 洗涤过程非常重要，洗涤不充分会使精确度下降并导致结果误差较大。
- 检测标准品和样品时建议设置重复孔，以确保检测结果的可信度。
- 加样过程中须避免气泡的产生。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 样品准备

a. 样品的准备请按下列流程进行操作：

- (a) 细胞上清样品离心取上清即可(如100-500g，5分钟)。
- (b) 对于血清样品，将全血在室温下放置30分钟至2小时，不要剧烈摇晃以免溶血，待全血自然凝固并析出血清后，4℃约1000-2000g离心10分钟，取黄色上清即得血清，注意不要吸取白色或淡黄色沉淀。制备好的血清需置于冰上待用。
- (c) 对于血浆样品，采集的全血建议使用EDTA进行抗凝处理，混匀后置冰上，4℃约1000-2000g离心10分钟，取黄色或淡黄色上清即得血浆，注意不要吸取白色沉淀。制备好的血浆需置于冰上待用。
- (d) 若待测样品不能及时检测，样品制备后请分装，冻存于-20℃或-80℃，并注意避免反复冻融。

b. 血清样品不应添加任何防腐剂或抗凝剂。

c. 样品应清澈透明，检测前样品中如有悬浮物应通过离心去除。

d. 请勿使用溶血、高血脂或污染的样品检测，否则结果将不准确。

注：血清或血浆样品可能需要用1X标准品稀释液适当稀释后再检测。

2. 检测前准备工作

a. 试剂盒从冰箱中取出后应置室温(25-28℃)平衡20分钟；每次检测后剩余试剂请及时置于4℃保存。

b. 配制适当量的标准品稀释液：将标准品稀释液(5X)用双蒸水或去离子水稀释至1X，例如10ml标准品稀释液(5X)加40ml水混匀后即为1X的标准品稀释液。

c. 配制适当量的洗涤液：将洗涤液(20X)用双蒸水或去离子水稀释至1X，例如10ml洗涤液(20X)加190ml水混匀后即为1X的洗涤液。

d. 按标准品标签上标注的体积加入标准品稀释液至1瓶标准品中，室温孵育15分钟(为确保标准曲线的准确性，切勿缩短孵育时间)。随后轻轻混匀并用移液枪吹打几次使标准品彻底溶解，使标准品终浓度达到2000pg/ml。通常每个浓度的标准品需要检测2个孔，每个孔的标准品用量为100μl，共需200μl，同时稀释时还需要使用250μl，因此如果1瓶标准品配制

后的体积不足0.45ml, 请使用更多瓶数的标准品, 并在合并混匀后使用。

- e. 取5个洁净的1.5毫升离心管, 每管预先加入250 μ l的标准品稀释液, 并参考图2进行标准品的倍比稀释, 最终得到2000、1000、500、250、125、62.5pg/ml共六个标准品浓度, 最后将稀释好的标准品依次加入预包被板孔中, 标准品稀释液直接加入作为0pg/ml浓度, 共七个标准品浓度。

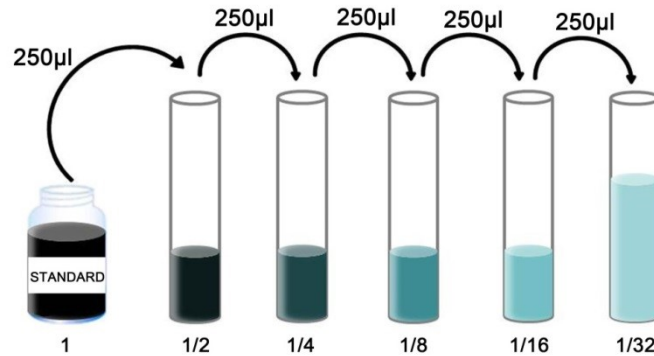


图2. 标准品倍比稀释示意图。按标准品(STANDARD)标签上标注体积加入标准品稀释液溶解并混匀后的浓度为标准品的起始浓度。其它的倍比稀释后的浓度依次为起始浓度的1/2、1/4、1/8、1/16和1/32。

3. 洗涤方法

自动洗板机或手工洗板: 每孔洗涤液为300 μ l, 注入与吸出间隔15-30秒。洗板5次。最后一次洗板完成后将板倒扣在厚吸水纸上适当用力拍干。

4. 实验过程需自备的材料和仪器

- 不同规格的移液枪及相应的吸头
- 酶标仪
- 自动洗板机(如果没有也可以手工洗板)
- 去离子水或双蒸水

5. 操作步骤

- 计算并确定一次实验所需的预包被板条数, 取出所需板条放置在96孔框架内, 暂时用不到板条请放回铝箔袋密封, 保存于4 $^{\circ}$ C。
- 每次实验都需配制标准品并绘制出标准曲线, 同时建议设置本底校正孔, 即空白孔, 设置方法为该孔只加TMB溶液和终止液。
- 分别将样品或不同浓度标准品按照100 μ l/孔加入相应孔中, 用封板膜(透明)封住反应孔, 室温孵育120分钟。对于血清或血浆样品的Leptin的检测, 不同样品稀释比例有所区别, 一般范围在5-20倍, 如无明确范围, 建议从10倍开始稀释, 加样稀释时, 先加入样品分析缓冲液50 μ l/孔, 再加入50 μ l用1X标准品稀释液稀释后的样品, 如果样品浓度过高, 超过检测范围, 请加大稀释倍数后重新稀释检测。请注意记录好样品的稀释倍数。

注意: 请先查阅相关文献确定样品中待检测蛋白的大致浓度, 如果该浓度大于或者小于本试剂盒的最高或者最低标准品浓度, 请适当稀释或浓缩后再进行检测。

- 洗板5次, 且最后一次置于厚吸水纸上拍干。
- 加入生物素化抗体100 μ l/孔(注: 此生物素化抗体已经预先配制好, 可以直接使用, 不必再进行稀释)。用封板膜(透明)封住反应孔, 室温孵育60分钟。
- 洗板5次, 且最后一次置于厚吸水纸上拍干。
- 加入辣根过氧化物酶标记Streptavidin 100 μ l/孔(注: 此辣根过氧化物酶标记Streptavidin已经预先配制好, 可以直接使用, 不必再进行稀释)。用封板膜(白色)封住反应孔, 室温避光孵育20分钟。室温偏低时(低于25 $^{\circ}$ C), 需要适当延长孵育时间。
- 洗板5次, 且最后一次置于厚吸水纸上拍干。
- 加入显色剂TMB溶液100 μ l/孔, 用封板膜(白色)封住反应孔, 室温避光孵育15-20分钟。室温偏低时需要适当延长孵育时间, 此时可以孵育至标准品出现非常显著的颜色变化, 若样品浓度足够高也会出现显著的颜色变化。
- 加入终止液50 μ l/孔, 混匀后立即测量A450值。

6. 结果分析

- 复孔的值通常在20%的差异范围内结果才有效, 复孔平均值可作为测量值。
- 每个标准品或样品的吸光度值应减去本底校正孔的吸光度值(如果没有做校正孔, 则不需要减去)。
- 绘制标准曲线。以标准品浓度为横坐标, A450值为纵坐标, 以平滑线连接各标准品的坐标点。通过样品的吸光度值和标准曲线计算出样品的相应浓度。

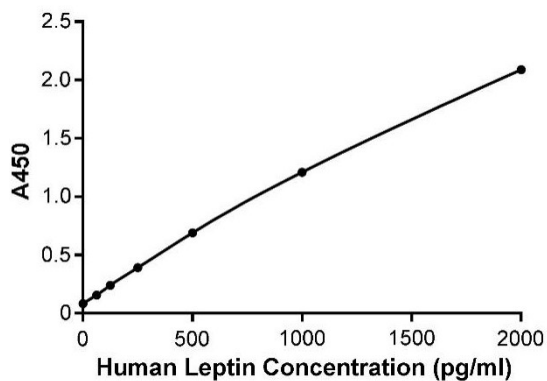


图3. Human Leptin ELISA Kit的标准曲线。实测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

d. 若样品OD值高于标准曲线上限，应适当稀释后重新测定，计算浓度时需注意乘以样品的稀释倍数。

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
PL698	Mouse Leptin ELISA Kit	96次
PL700	Human Leptin ELISA Kit	96次

Version 2023.03.01