EliKine™ 人中期因子ELISA定量试剂盒

Cat #: KTE3143 Size: 48 T/96 T

	人中期因子 ELISA 定量试剂盒		
REF	**货号：** KTE3143	LOT	**批号：** 见产品标签
	检测范围： 15.63 pg/mL-1,000 pg/mL		**灵敏度：** 15.63 pg/mL
	精密度：板内变异系数<10%, 板间变异系数<12%		**回收率：** 范围从 97%到 118%，平均回收率 106%
	特异性： 检测具有高灵敏度和优良的特异性。未观察到和人中期因子类似物之间的显着交叉反应或干扰。		
	适用样本： 血清（浆）、细胞培养上清		
	保质期： 4℃，避光保存 24 个月		

原理

Midkine (MK 或 MDK)是一种 15 kDa 的肝素结合分子，也被称为神经生长促进因子 2(NEGF2)，是一种由 MDK 基因编码的蛋白。Midkine 具有多效性，能发挥细胞增殖、细胞迁移、血管生成和纤维蛋白溶解等作用。在多种癌症类型中如神经母细胞瘤、大肠癌、肝癌、卵巢癌等发现有 Midkine 的表达。这些恶性肿瘤患者的血清中 Midkine 浓度要比正常人高得多。在某些情况下，这些高浓度的 Midkine 也预示着疾病的预后较差，如神经母细胞瘤、胶质瘤和膀胱癌。Midkine 作为一种低亲和力的受体与细胞表面的核仁素结合。这种结合可以抑制艾滋病毒感染。EliKine™人中期因子 ELISA 定量试剂盒采用双抗体夹心法来定量样品中的人中期因子。用抗人中期因子的特异性抗体包被于酶标板上，将样品或标准品加入酶标板的孔中，其中的人中期因子会与包被在板上的固相抗体结合。未结合的成分被洗去，然后将生物素化的抗人中期因子特异性抗体加入孔中。洗涤后，将专有的链霉亲和素-HRP 偶联物加入孔中。生物素化的抗人中期因子抗体与结合在包被抗体上的人中期因子结合、生物素与链霉亲和素特异性结合而形成免疫复合物。在洗涤去除任何未结合的链霉亲和素酶试剂后，加入显色底物(TMB)，TMB 在 HRP 催化下呈现蓝色，加终止液后变成黄色。用酶标仪在 450 nm 波长处测 OD 值，Midkine 浓度与 OD450 值之间呈正比。

包装清单

试剂盒组分	规格		储存条件
	48 T	96 T	
Human Midkine Microplate	48 wells	96 wells	4℃
Human Midkine Standard (lyophilized)	1	2	4℃
Assay Buffer (10×)	5 mL	5 mL	4℃
Human Midkine Detect Antibody (100×)	1	1	4℃
Streptavidin-HRP (100×)	1	1	4℃

Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.

HRP Substrate (TMB)	6 mL	11 mL	4℃，避光保存
Stop Solution	11 mL	11 mL	4℃
Wash Buffer (20×)	50 mL	50 mL	4℃
Plate Covers	6	6	室温

自备耗材

- 酶标仪（能测 450 nm 处的吸光度）
- 多通道移液器或自动洗板机
- 恒温箱、低温离心机
- 可调节式移液枪及枪头
- 去离子水

试剂准备

1×Assay Buffer：使用前，平衡到室温，用去离子水按 1:10 的比例稀释 Assay Buffer (10×)得到 1×Assay buffer，轻轻混合以避免起泡。4℃保存，此溶液可稳定保存 30 天。1×Assay buffer 用于稀释标准品、血清和血浆样品，Human Midkine Detect Antibody (100×)和 Streptavidin-HRP (100×)。

Human Midkine Standard: 加入标准品的标签上标注重悬体积的无菌水复溶 Human Midkine Standard 得到 2,000 pg/mL 标准品。在进行稀释之前，将标准品至少放置 15 min 并轻轻晃动，复溶后 Standard 可在-20℃保存 1 个月，重溶使用 1 次后丢弃。

1×Human Midkine Detect Antibody： 稀释前充分混合。根据标准品和样品所需要的量，在干净的塑料管中用 1×Assay buffer 对 Human Midkine Detect Antibody（100×）进行 1:100 稀释。1×Human Midkine Detect Antibody 应在稀释后 30 min 内使用。

1×Streptavidin-HRP：稀释前充分混合。根据标准品和样品所需要的量，在干净的塑料管中用 1×Assay buffer 对 Streptavidin-HRP（100×）进行 1:100 稀释。1×Streptavidin-HRP 应在 30 min 内使用。

HRP Substrate (TMB)：即用型；使用前，平衡到室温；4℃避光保存。

Stop Solution：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

1×Wash Buffer: 使用前平衡到室温，用去离子水进行 1:20 稀释得到 1×Wash buffer。 轻轻混合以避免起泡，室温保存，此溶液可稳定保存 30 天。

标准曲线设置：按下表所示，用 1×Assay Buffer 将 2,000 pg/mL 标准品稀释为 1000、500、250、125、62.5、31.25、15.63 和 0 pg/mL 的 Human Midkine 标准品。

序号	标准品体积	1×Assay Buffer 体积（μL）	标准品浓度（pg/mL）
Std.1	230 μL of 2,000 pg/mL	230	1000
Std.2	230 μL of Std.1 (1,000 pg/mL)	230	500
Std.3	230 μL of Std.2 (500 pg/mL)	230	250
Std.4	230 μL of Std.3 (250 pg/mL)	230	125
Std.5	230 μL of Std.4 (125 pg/mL)	230	62.5
Std.6	230 μL of Std.5 (62.5 pg/mL)	230	31.25
Std.7	230 μL of Std.6 (31.25 pg/mL)	230	15.63
Std.8	0	230	0

注意：每次实验都需要新配制标准品。

样本制备

Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.

1. 细胞培养上清：离心除去颗粒，立即测定或分装-20℃保存，避免反复冻融。

2. 血清：使用血清分离管，让样品在室温下凝结 30 min，然后 1,000 g 离心 15 min。 取上层血清立即测定或分装-20℃保存，避免反复冻融。

3. 血浆：使用 EDTA、肝素或柠檬酸盐作为抗凝剂收集血浆。在收集后 30 min 内 1,000 g 离心 15 min。立即测定或分装-20℃保存，避免反复冻融。

注意：不要使用严重溶血或脂血的标本。如果样品要在 24 h 内使用，则可以将其储存在 2 至 8℃，避免反复冻融。测定前，应将冷冻样品缓慢升至室温并轻轻混合。

实验步骤

1. 从板框上取下多余的板条，将它们放回装有干燥剂包的铝箔袋中，然后重新密封。

2. 除去每孔中的液体并洗涤。使用多通道移液器或自动清洗机每孔加入 300 µL 1×Wash buffer 静置浸泡 30 s，进行洗涤。在每个步骤中完全去除液体对于获得良好性能至关重要。最后一次洗涤后，倒置酶标板并用干净的纸巾吸干以除去任何剩余的 1×Wash buffer。洗板完成之后，请立即使用微孔板，不要让微孔板干燥。

3. 加标准品：标准品孔加入 100 µL 稀释的标准品。

4. 加样品：血清/血浆：样本孔加入 100 µL 预稀释样本；细胞培养上清：样本孔加入 100 µL 细胞培养上清（详见样本制备）。保证步骤 3、4 连续加样，不要间断。加样过程在 15 min 内完成。给酶标板覆膜，在室温下孵育 2 h。

5. 重复步骤 2 中的洗涤 6 次。

6. 加检抗：每孔加入 100 µL 1×Human Midkine Detect Antibody。给酶标板覆膜，在室温下孵育 1 h。

7. 重复步骤 2 中的洗涤 6 次。

8. 每孔加入 100 µL 1×Streptavidin-HRP。给酶标板覆膜，在室温下孵育 45 min，注意避光。

9. 按照步骤 3 重复洗涤过程 6 次。

10. 每孔加入 100 µL HRP Substrate (TMB)。给酶标板覆膜，并在室温下避光孵育 5-30 min。

11. 每孔加入 100 µL Stop Solution，Stop Solution 应按照与 TMB 相同的顺序加到板中。孔中的颜色应从蓝色变为黄色。如果孔中的颜色为绿色或颜色变化不均匀，请轻轻敲击板以确保彻底混合。

12. 在 30 min 内，测定每孔 450 nm 处的吸光值。

注意：5-30 min 显色时间为经验范围，每个具体的实验，可根据以下情况，确定大致的显色时间。

1) 肉眼观察：标曲 S5 孔有淡蓝色、Blank 孔无明显蓝色时，即可终止；

2) 仪器判断：630 nm 左右波长下，标曲 S1 孔的 OD 值达到 0.5-0.7、S5 孔的 OD 值达到 0.05-0.08、Blank 孔的 OD 值小于 0.05 时，即可终止。

结果计算

1. 计算每个标准品和样品的复孔平均 OD 值，并减去零浓度（Std.8）平均 OD 值。

2. 标准曲线的绘制：以标准品浓度为 x 轴，各标准品的平均吸光度为 y 轴，绘制标准曲线。可以使用作图软件来创建标准曲线。

注意：如果样品被稀释，从标准曲线读取的浓度必须乘以稀释系数。

结果展示

典型标准曲线（$R^2 \geqslant 0.99$）

Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.

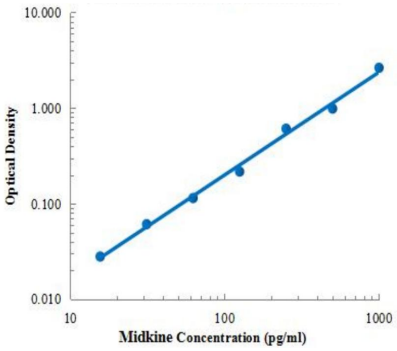


Figure1. 96 孔板分析的人中期因子标准曲线。数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线

注意事项

1. 如果 Assay Buffer (10×)出现颜色变黄，少量沉淀等现象，是因为试剂中含有血清导致，离心去掉沉淀即可，不影响正常使用。
2. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
3. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。
4. 为确保准确的结果，在孵育步骤中必须正确粘附板贴。
5. Stop Solution 有一定的腐蚀性，操作时请做好防护措施。

常见问题

问题	原因	解决建议
标准曲线无线性	加样不准	检查移液器
	稀释不当	开管前轻柔搅拌和旋转标准品保存管使粉末完全溶解
信号过低	样本孵育时间过短	确保足够的孵育时间；标准/样品孵育时间增加到 2 或 3 小时
	试剂体积不足或稀释不当	检查移液器并确保准备充分
	TMB 孵育时间过短	加 Stop Solution 之前，确保有足够的孵育时间，直到出现蓝色
高背景/CV 值过高	洗板不充分	仔细检查清洗步骤. 如果使用洗板机，检查所有接口
	Wash Buffer 被污染	准备新鲜的 Wash Buffer
低灵敏度	试剂盒保存不当	复溶的标准品-20℃保存（避免反复冻融），其他组分 4℃保存，TMB 注意避光
	终止问题	测量读数前需在所有孔中加入 Stop solution 终止

免责声明

本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.