

脂联素定量检测试剂盒（酶联免疫法）说明书 V4.0

10-1193-01

96 人份试剂



由瑞典 Mercodia AB 制造

用于标签上的标识的说明

 $\Sigma = 96$	96 测试试剂
	失效日期
	在 2-8°C 下储存
	批号
	用于体外诊断

预期用途

脂联素定量检测试剂盒（酶联免疫法）提供了一种人血清或血浆样本中脂联素的定量检测方法。

本试验的综述和说明

脂联素也被称为 Acrp30（脂肪细胞补体相关蛋白 30kDa）、GBP28（凝胶结合蛋白）、adipoQ、apM1（脂肪最丰富的基因转录 1）^[1, 2]。

脂联素是一种脂肪细胞分泌的激素，由 244 种氨基酸组成，分子量约为 30kDa(28-30kDa)。它是人血液中含有量最大的蛋白之一，在外周血中的浓度为 0.5-30 μ g/mL，约占总血浆蛋白的 0.01%。

该蛋白由四种结构域组成：一个球状 C 端、一个类胶原蛋白 N 端、一个信号肽段和一个高变结构。球状结构域与补体因子 C1q 具有显著的序列和结构相似性^[2, 3]。球状结构域与肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 也具有结构相似性^[3, 5]。

脂联素浓度与 2 型糖尿病、冠状动脉疾病和肥胖症呈反向相关，这些被统称为新陈代谢症候群。脂联素能降低血清中血糖和游离脂肪酸浓度，并能增强胰岛素敏感性^[7]。另外脂联素也表现出抗炎作用。

脂联素被认为以不同的形式存在于血液循环中：单体、独立的球状形式（球状结构域）、三聚体、六聚体和更大的寡聚体^[8-11]。单体被认为与循环系统中球状结构域到三聚体的转变有关。三聚体与类胶原蛋白结构域到更大的寡聚体的转变有关^[7]。

然而，最近的研究表明脂联素可能不以单体或独立的球状结构形式而是以多亚基的结构存在于循环系统中。这些研究表明循环于血液中的脂联素的主要形式是六聚体（LMW）和更大的寡聚体（HMW）^[6, 12-14]。LMW 脂联素水平在胰岛素敏感性和胰岛素抵抗性受试者间未发现存在差异，在男性和女性间也未发现存在差异。胰岛素敏感性受试者和女性总脂联素水平升高是由 HMW 脂联素增高引起的。据 Lara-Castro et al. 2006 报道，胰岛素敏感性和胰岛素抵抗性受试者的总脂联素和 HMW 脂联素都表现为具有显著差异。

胰岛素的多种异构体循环于血液中。是否所有的异构体都是由脂肪细胞分泌的、血液中是否存在 HMW 脂联素转录后组装、HMW 形式是否在血液中分泌和降解，这些问题仍待确定。每种脂联素异构体的代谢意义仍不明确^[6]。

检测程序的原理

脂联素定量检测试剂盒（酶联免疫法）是一种固相双表位酶联免疫试剂。它基于双夹心技术，两单克隆抗体分别结合在脂联素分子的抗原决定簇上。在孵育过程中，样本中的脂联素与结合在微孔（板）中的抗-脂联素抗体反应。经洗涤后，加入过氧化物酶偶联的抗-脂联素抗体，经过第二次孵育和一个简单的洗涤步骤，移去了未结合的酶标抗体，结合的偶联物通过与 3,3',5,5'-四甲基联苯胺（TMB）反应而被检测到。加入酸后反应终止，然后通过分光光度计（酶标仪）读取反应的终点。

警告和注意事项

- 不能用于人类或动物的内服或外用。
- 不能让反刍动物或猪接触到本试剂盒的内容物及其残余物。
- 本试剂盒的终止溶液含有 0.5M 的硫酸。按常规预防措施处理危险化学品。
- 所有的患者样本都应按潜在传染物处理。

要求但未提供的材料

- 20 μ L、25 μ L、50 μ L、100 μ L、200 μ L、1000 μ L 移液管（重复移取加入酶结合物溶液、底物 TMB 和终止溶液）
- 用于试剂制备的烧杯和量筒
- 重蒸水
- 酶标仪（含 450nm 滤光片）
- 平板振荡器（建议速率 700-900 循环/分钟，轨道运动）
- 微孔板（酶标板）洗涤设备

试剂

每个脂联素定量检测试剂盒（酶联免疫法）都包含 96 孔的试剂，足够用于双份的 42 个样本和 1 个校准曲线。对于更大量的试验，用标有相同批号的包装中的试剂。完整的试剂盒的失效日期在外包装上。建议储存温度为 2-8 $^{\circ}$ C。

包被微孔板	1 个平板	96 孔	即用
（鼠抗-人脂联素单克隆抗体）	8 孔的条		

对于未使用过的微板条，用胶带重新密封在袋子里，储存在 2-8°C，在 2 周内使用。

校准品 1、2、3、4、5	5 瓶	1000 μ L	即用
重组人脂联素 浓度标示在瓶标签上。黄色			
校准品 0	1 瓶	5mL	即用
黄色			
试验缓冲液	1 瓶	12 mL	即用
红色			
样本缓冲液 2\times	1 瓶	50mL	
用 50mL 重蒸水稀释，制作样本缓冲液 黄色 稀释后储存：2-8°C 两周			
酶结合物 11\times	1 瓶	1.3mL	制备，见下文
(过氧化物酶结合的鼠抗-人脂联素单克隆抗体)			
酶结合物缓冲液	1 瓶	13mL	即用
蓝色			
洗涤缓冲液 21\times	1 瓶	40mL	即用
用 800mL 重蒸水稀释，制作洗涤缓冲液 稀释后储存：2-8°C 两周			
底物 TMB	1 瓶	22mL	即用
(TMB) 无色溶液 注意！光敏！			
终止溶液	1 瓶	7mL	即用
0.5M 硫酸			

酶结合物溶液的制备

按下表，用酶结合物缓冲液稀释酶结合物 11 \times (1+10)，来制备所需体积的酶结合物溶液。当为整个平板制备酶结合物溶液或者溶液在两个月内使用时，将所有酶结合物缓冲液倒

入酶结合物 11×瓶中。

条数量	酶结合物 11×	酶结合物缓冲液
12 条	1 瓶	1 瓶
8 条	700μL	7mL
6 条	500μL	5mL
4 条	400μL	4mL

稀释后储存：2-8℃两个月

样本的收集和处理

血清

通过静脉穿刺收集血液，允许结块，然后通过 2-8℃ 下 4300g 离心 15 分钟分离血清。样本可以在 2-8℃ 下储存至 14 天。对于更长时间，样本应储存在 -20℃。避免反复冻融。

血浆

通过静脉穿刺将血液收集在含肝素、柠檬酸盐或 EDTA 抗凝血剂的试管里，分离血浆成分。样本可以在 2-8℃ 下储存至 14 天。对于更长时间，样本应储存在 -20℃。避免反复冻融。

样本的制备

样本应用样本缓冲液按 1/101 的比例稀释（20μL 样本+2.0mL 样本缓冲液）。稀释后的样本可以在 2-8℃ 储存至 14 天。注意！含有叠氮钠（NaN₃）的缓冲液不能用于样本稀释。

检测步骤

在使用前，所有的试剂和样本都应放至室温。每次试验都要做一个标准曲线。

1. 制备酶结合物溶液（按照前页的表）、样本缓冲液、洗涤缓冲液和样本。
2. 制备足够用于一式两份的校准品和样本的微孔(板)。
3. 吸取 25μL 各水平校准品和样本到适当的孔中。
4. 向各孔中加入 100μL 试验缓冲液。
5. 将上述微孔板放入平板振荡器（700-900rpm）在室温下（18-25℃）培养 1 小时。

6. 用全自动洗板机洗涤 6 次，或将反应体积完全吸入并向每孔中加入 350 μ L 洗涤缓冲液。
将液体完全吸入。重复 5 次。在最后一次洗涤后，将平板倒置在吸水纸上，并轻轻拍打。
7. 向每孔中加入 100 μ L 酶结合物溶液。
8. 放入平板振荡器在室温下（18-25 $^{\circ}$ C）培养 1 小时。
9. 用全自动洗板机洗涤 6 次，或将反应体积完全吸入并向每孔中加入 350 μ L 洗涤缓冲液。
将液体完全吸入。重复 5 次。在最后一次洗涤后，将平板倒置在吸水纸上，并轻轻拍打。
10. 向每孔中加入 200 μ L 底物 TMB。
11. 在室温下（18-25 $^{\circ}$ C）培养 15 分钟，不需振荡，
12. 加入 50 μ L 终止溶液。
将平板放入振荡器约 5 秒以确保混匀。
13. 在 450nm 下读取光密度值并计算结果。
在 30 分钟内读数。

注意！为防止结合物和底物之间的污染，建议单独使用移液器。

内部质量控制

对于商品质控品如 Mercodia Obesity 质控试剂盒（10-1241-01）和/或含有低、中和高浓度脂联素的内部血清，应该像检测未知样本一样进行日常检测，并每天记录结果。对各试验的以下数据进行记录是良好的实验室规范：试剂盒批号、试剂盒组分稀释液和/或重悬日期、空白（样本缓冲液）、校准品和质控品的 OD 值。

结果的计算

计算机计算

脂联素的浓度是通过将校准品 1-5 计算机数据演化吸收值对浓度做三次样条回归而得。

人工计算

1. 将除校准品 1-5 的吸收值对脂联素浓度做 lin-log 图，并创建一个校准曲线。
2. 在校准曲线上读取未知样本的浓度。
3. 将浓度值乘以稀释因子。

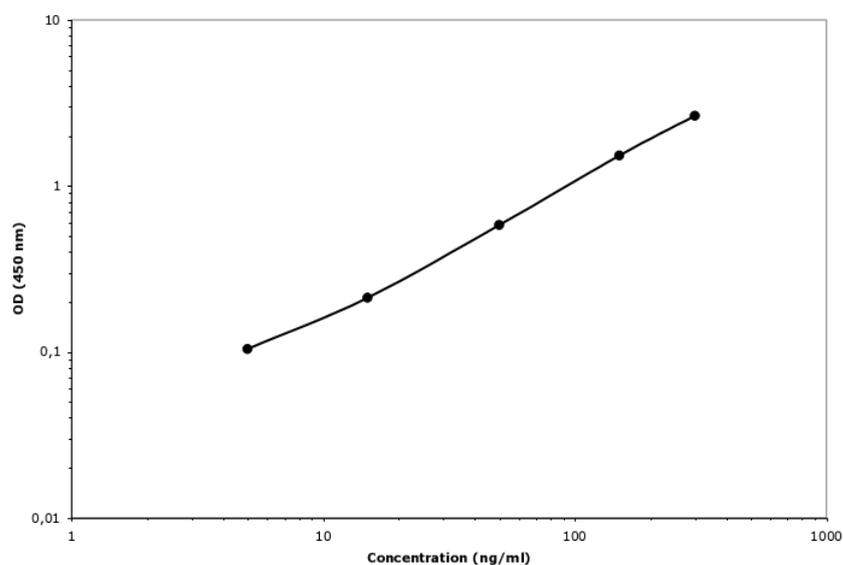
结果示例

孔	样本	A ₄₅₀	平均浓度 ng/mL	×101μg/mL
1A-B	校准品 0	0.059/0.056		
1C-D	校准品 1 (5ng/mL) *	0.106/0.102		
1E-F	校准品 2 (15ng/mL) *	0.207/0.216		
1G-H	校准品 3 (50ng/mL) *	0.563/0.559		
2A-B	校准品 4 (150ng/mL) *	1.477/1.567		
2C-D	校准品 5 (300ng/mL) *	2.602/2.681		
2E-F	未知样本 1	0.374/0.367	29.825	3.012
2G-H	未知样本 2	0.754/0.758	67.178	6.875
3A-B	未知样本 3	1.385/1.373	133.340	13.467

*瓶标签上标示的浓度

校准曲线示例

典型的校准曲线如下所示。不要使用本曲线来确定实际试验结果。



程序的局限性

正如所有的诊断测试，一个确定的诊断不能仅基于单一的测试结果，而是由医生在所有临床发现评估后做出。

高血脂、黄疸或溶血样本不会对本试验造成影响。

期望值

良好的规范决定了每个实验室要建立他们自己的期望值范围。

本试剂盒检测 LMW（六聚物 230kDa）和 HMW（寡聚体>420kDa）脂联素，如体积排阻凝胶色谱测定一样。

用三步法对健康个体血清中的内源性脂联素的不同多亚基形式进行了研究和分离；硫酸铵沉淀后进行离子交换和凝胶过滤色谱。

由于不同的蛋白/异构体具有不同的净电荷或等电点，通过离子交换色谱，可以使以静电力与基质结合的蛋白分离。使用的离子交换柱为 Mono Q 10/100GL（GE Healthcare）。用三乙醇胺缓冲液洗提蛋白。

脂联素的异构体表现为具有不同的等电点和翻译后模式[15]。脯氨酸羟基化和赖氨酸羟基化/糖基化被认为在寡聚体的组装中具有重要作用[12, 15]。

用离子交换色谱分离血清脂联素，可以看到 5 个分离清晰的峰，这表明血清脂联素至少有 5 种翻译后模式、产生 5 种不同的等电点，见下图 1。用体积排阻凝胶色谱对馏分 A-E 进行了进一步分析，以确定多聚体脂联素形式的表面尺寸。

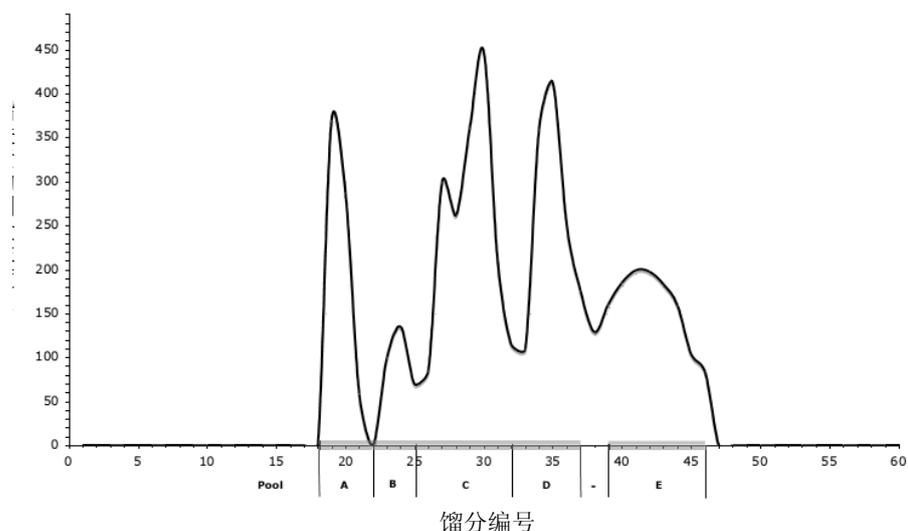


图 1: 用离子交换色谱分离并用脂联素检测试剂盒(酶联免疫法)确认的血清脂联素洗提图。峰馏分收集为馏分 A、B、C、D 和 E。

体积排阻凝胶色谱按照外表球状的大小来分离蛋白。使用的凝胶过滤柱为 HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade（GE Health care）。用 PBS 洗提蛋白。

当使用体积排阻凝胶色谱来分别血清脂联素时，可见到三个主要的寡聚物形式，大小分别为 230kDa、420kDa 和>600kDa，并解读为 LMW（六聚体 230kDa）和 HMW（420kDa）

和>600kDa)。见下图 2。

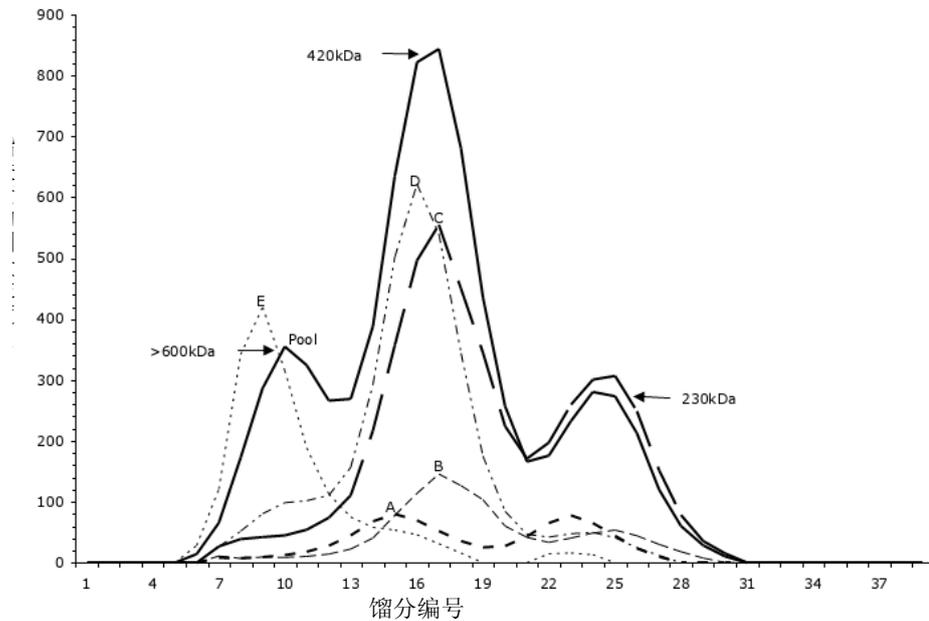


图 2: 用体积排阻凝胶过滤色谱分离并用脂联素检测试剂盒（酶联免疫法）确认的血清脂联素洗提图。对每个馏分（A、B、C、D 和 E）进行了分别分析和整体分析。

综上，对血清脂联素分析发现了以尺寸为基础的 3 种主要的多聚物形式，和以等电点或总净电荷为基础的 5 种不同形式。

性能指标

检出限

检出限是按照 ISO11843 第 1 部分检测能力来确定的。检测能力应被视为试验方法确证的一部分，而不是能够检测到的最低浓度。

按照 ISO11843 第 4 部分所述的方法，确定了检出限是 1.25ng/mL。

吸收值低于校准品 1 的样本浓度不需计算，但应表述为小于或等于 (\leq) 校准品 1 瓶子上标示的浓度值。

回收率

加入的回收率为 92-109%（平均值为 101%）

稀释的回收率为 89-111（平均值 98%）

钩状效应

不存在钩状效应。

精密度

对来自 39 个不同地点的样本进行 4 个重复试验。

样本	平均值 ng/mL	批内%	变异系数%	
			批间%	总体%
1	29.7	3.0	5.3	5.5
2	65.9	2.7	5.0	5.2
3	13.0	3.0	5.8	6.0

特异性

发现了下列交叉反应：

C1q	≤0.007%
TNF-α	n.s

校准

脂联素定量检测试剂盒（酶联免疫法）是用高纯度、充分确证的商品 MPO 制备方法来校准的。脂联素的浓度用 ng/ml 来表示。

保证

在此发布的性能数据是按指定的程序操作获得的。任何非 Merckodia AB 建议的对程序的变更或修改都可能会影响试验结果，在这种情况下，Merckodia AB 会放弃所有明示的、隐含的或法定的保证，包括使用的适销性或适合性的隐含的保证。在这种事件中，Merckodia AB 及其授权分销商，不对由此引发的间接损害负责。

参考文献

- [1] PDB, Protein Data Bank: www.expasy.org, adiponectin: Q 15848 (21 oct.2005)
- [2] Meier U and Gressner AM (2004) Endocrine Regulation of Energy Metabolism: Review of Pathobiochemical and Clinical Aspects of Leptin, Ghrelin, Adiponectin, and Resistin. *Clin Chem* 50:1511-1525
- [3] Tsao TS, Lodish HF and Fruebis J (2002) ACRP30, a new hormone controlling fat and glucose metabolism. *Eur J Pharmacol* 440:213-221
- [4] Shapiro L and Scherer PE (1998) The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor. *Curr Biol* 12:335-338
- [5] Bobbert T, Rochlitz H, Wegewitz U, Akpulat S, Mai K, Weickert MO, Mohlig M, Pfeiffer AF and Spranger J (2005) Changes of adiponectin oligomer composition by moderate weight reduction. *Diabetes* 54:2712-2719
- [6] Lara-Castro C, Luo N, Wallace P, Klein RL and Garvey T (2006) Adiponectin Multimeric Complexes and the Metabolic Syndrome Trait Cluster. *Diabetes* 55: 249-259
- [7] Duntas LH, Popovic V and Panotopoulos G (2004) Adiponectin: Novelities in Metabolism and Hormonal Regulation. *Nutr Neurosci* 7:195-200
- [8] Tsao TS, Lodish HF and Fruebis J (2002) ACRP30, a new hormone controlling fat and glucose metabolism. *J Biol Chem* 50:50810-50817
- [9] Nakashima R, Kamei N, Yamane K, Nakanishi S, Nakashima A and Kohno N (2006) Decreased Total and High Molecular Weight Adiponectin Are Independent Risk Factors for the Development of Type 2 Diabetes in Japanese-Americans. *Clin Endocrinol Metab* 91:3873-3877
- [10] Hara K, Horikoshi M, Yamauchi T, Yago H, Miyazaki O, Ebinuma H, Imai Y, Nagai R, and Kadowaki T (2006) Measurement of the High-Molecular Weight Form of Adiponectin in Plasma Is Useful for the Prediction of Insulin Resistance and Metabolic Syndrome. *Diabetes Care* 29:1357-1362
- [11] Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T and Tomita M (1996) Isolation and Characterization of GBP28, a Novel Gelatin-Binding Protein Purified from Human Plasma. *J Biol Chem*

120:803-812

[12] Bodles AM, Banga A, Rasouli N, Ono F, Kern PA and Owens RJ (2006) Pioglitazone increases

secretion of high-molecular-weight adiponectin from adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291:E1100-E1105

[13] Halperin F, Beckman JA, Patti ME, Trujillo ME, Garvin M, Creager MA, Scherer PE and Goldfine

AB (2005) The role of total and high-molecular-weight complex of adiponectin in vascular function in offspring whose parents both had type 2 diabetes. *Diabetologia* 48:2147-2154

[14] Fisher FF, Trujillo ME, Hanif W, Barnett AH, McTernan PG, Scherer PE, and Kumar S (2005)

Serum high molecular weight complex of adiponectin correlates better with glucose tolerance than total serum adiponectin in Indo-Asian males. *Diabetologia* 48:1084-1087

[15] Wang Y, Lu G, Wong WP, Vliegenthart JF, Gerwig GJ, Lam KS, Cooper GJ and Xu A (2004) Proteomic and functional characterization of endogenous adiponectin purified from fetal bovine serum. *Proteomics* 4:3933-3942

方案概要表

脂联素 ELISA 试剂盒

加入校准品和样本	25 μ L
加入试验缓冲液	100 μ L
培养	在 18-25 $^{\circ}$ C 下用平板振荡器振荡 1 小时
用洗涤缓冲液洗涤平板	6 次
加入酶结合物溶液	100 μ L
培养	在 18-25 $^{\circ}$ C 下用平板振荡器振荡 1 小时
用洗涤缓冲液洗涤平板	6 次
加入底物 TMB	200 μ L
培养	在 18-25 $^{\circ}$ C 下 15 分钟
加入终止溶液	50 μ L 振荡 5 秒钟以确保混匀
在 A450 下测量	评估结果

31-3157

Version 4.0