



上海源叶生物科技有限公司  
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd  
电话: 400-666-5481 传真: 021-55068248  
网址: [www.shyuanye.com](http://www.shyuanye.com)  
邮箱: 3008007435@qq.com

## 人胱抑素C酶联免疫吸附测定试剂盒

货号: R90016-96T

### 储存条件:

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:

|      |                         |
|------|-------------------------|
| 规格   | 96次                     |
| 检测范围 | 31.25 pg/mL~2,000 pg/mL |
| 敏感性  | 10 pg/mL                |
| 特异性  | 系统和其它因子无交叉反应            |
| 样本类型 | 人血清、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 法检测样品中人 Cystatin C 的浓度。人 Cystatin C 捕获抗体已经预包被于酶标板上,当加入样品或标准品时,其中的人 Cystatin C 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人 Cystatin C 抗体后,抗人 Cystatin C 抗体与人 Cystatin C 接合,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,若样品中存在人 Cystatin C,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,人 Cystatin C 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,即可计算出样品中人 Cystatin C 的浓度。

### 背景简介:

Cystatin C (胱抑素 C, 又称半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 或  $\gamma$ -微量蛋白) 是一种由所有有核细胞以恒定速率产生的小分子蛋白质 (分子量约 13 kDa), 属于 2 型



半胱氨酸蛋白酶抑制剂超家族成员。它可自由通过肾小球滤过膜，并在近端肾小管被完全重吸收和降解，不被肾小管分泌，因此其血清浓度仅取决于肾小球滤过率（GFR），是评估肾功能理想的内源性标志物。与肌酐相比，胱抑素 C 不受年龄、性别、肌肉量、饮食及炎症状态等因素影响，尤其在早期肾功能损害、老年人和肌肉萎缩患者中更具诊断优势。此外，胱抑素 C 还参与调控半胱氨酸蛋白酶活性、参与动脉粥样硬化斑块形成、调控免疫应答及肿瘤转移等病理生理过程，其升高与心血管疾病、代谢综合征及全因死亡率风险增加独立相关。

#### 产品内容:

| 组分                   | 体积或数量           |
|----------------------|-----------------|
| 人Cystatin C预包被板      | 8孔条×12个         |
| 样品稀释液                | 30 mL           |
| 重组人Cystatin C标准品(冻干) | 2支(50 ng/支)     |
| 生物素标记人Cystatin C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℃, 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( $4^{\circ}\text{C}$ ,  $1,000\sim 2,000\times g$ , 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 $-20^{\circ}\text{C}$ , 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  $20\sim 200\text{ ng/mL}$  范围内, 一般按 1:100 稀释, 即向  $297\text{ }\mu\text{L}$  样品稀释液中加入  $3\text{ }\mu\text{L}$  样品;

② 待测因子含量在  $2\sim 20\text{ ng/mL}$  范围内, 一般按 1:10 稀释, 即向  $225\text{ }\mu\text{L}$  样品稀释液中加入  $25\text{ }\mu\text{L}$  样品;

③ 待测因子含量在  $31.25\sim 2,000\text{ pg/mL}$  范围内, 一般按 1:2 稀释, 即向  $100\text{ }\mu\text{L}$  样品稀释液中加入  $100\text{ }\mu\text{L}$  样品;

④ 待测因子含量 $\leq 31.25\text{ pg/mL}$ , 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  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱取出后, 请置于室温平衡 20 min; 如从  $-20^{\circ}\text{C}$  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  $4^{\circ}\text{C}$  或  $-20^{\circ}\text{C}$  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. 重组人Cystatin C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 50 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 40 μL 50 ng/mL 的标准品加入有 960 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. 准备生物素标记人 Cystatin C 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 100~200μL);

② 按 1 μL 生物素标记人 Cystatin C 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  $\mu\text{L}$  酶复合物 添加 99  $\mu\text{L}$  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 $^{\circ}\text{C}$  或 -20 $^{\circ}\text{C}$ ;

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  $\mu\text{L}$ / 孔 ) 分别加入相应孔中, 用封板胶纸封住反应孔, 37 $^{\circ}\text{C}$  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人 Cystatin C 抗体工作液 (100  $\mu\text{L}$ / 孔 ), 用封板胶纸封住反应孔, 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 60 min;

12. 洗板 5 次, 每孔 1 $\times$  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  $\mu\text{L}$ / 孔 ), 用封板胶纸封住反应孔, 37 $^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{L}$ / 孔 ), 用封板胶纸封住反应孔, 避光 37 $^{\circ}\text{C}$  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  $\mu$ 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。

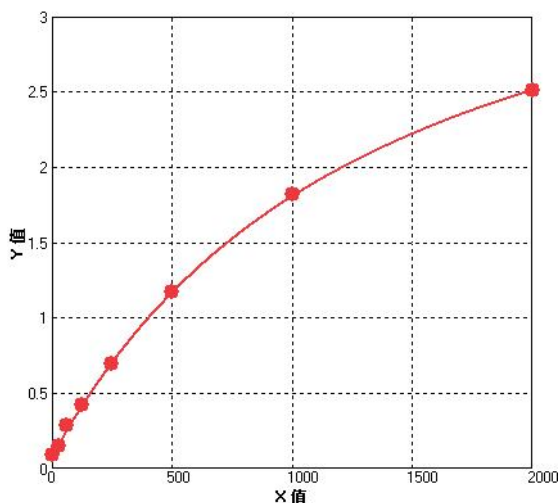
注意:① 复孔 OD 值在 20% 的差异范围内结果才有效,复孔 OD 值取平均后可作为测量值;

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

人Cystatin C参考标准曲线

| 标准品浓度       | O.D.  |
|-------------|-------|
| 0 pg/mL     | 0.085 |
| 31.25 pg/mL | 0.153 |
| 62.5 pg/mL  | 0.284 |
| 125 pg/mL   | 0.423 |
| 250 pg/mL   | 0.695 |
| 500 pg/mL   | 1.172 |
| 1,000 pg/mL | 1.818 |
| 2,000 pg/mL | 2.512 |



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。



上海源叶生物科技有限公司  
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd  
电话: 400-666-5481 传真: 021-55068248  
网址: [www.shyuanye.com](http://www.shyuanye.com)  
邮箱: 3008007435@qq.com

---

**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℃;
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。



源叶