

# Human PBEF/Visfatin ELISA 试剂盒

产品编号# CHE0086 (48/96 孔)

适用于人血清、血浆或细胞培养上清液等样本

仅供研究，不用于临床诊断。



客服热线: 400-7060-959 \* 技术支持邮箱: [tech@4abio.com](mailto:tech@4abio.com)  
公司官网: [www.4abio.net](http://www.4abio.net)

## 目录

简介 .....	- 3 -
检测原理 .....	- 3 -
试剂盒组分 .....	- 4 -
储存条件 .....	- 4 -
其他实验材料（不提供，但可协助购买）： .....	- 5 -
注意事项 .....	- 5 -
样本收集处理及保存方法 .....	- 5 -
试剂准备 .....	- 6 -
操作步骤 .....	- 7 -
操作流程图 .....	- 8 -
操作要点提示 .....	- 8 -
结果判断 .....	- 8 -
结果重复性 .....	- 9 -
灵敏度 .....	- 9 -
特异性 .....	- 9 -
参考文献 .....	- 10 -

 该产品由北京四正柏生物科技有限公司研制。

 请根据试剂盒中所附说明书指引进行实验。

## 简介

PBEF/Visfatin（前 B 细胞克隆增强因子）是近年来在内脏脂肪组织中发现的一类高表达的细胞因子，也被命名为内脏脂肪素（Visfatin），PBEF/Visfatin 广泛分布在各种内脏组织中，尤其在肝脏、肺、心脏、脑、肾脏、胎膜等组织中高度表达并发挥着重要的作用。

PBEF/Visfatin 蛋白分子量为 52KD，该蛋白包含 2 个天门冬酰胺糖基化位点，4 个蛋白激酶磷酸化位点和 5 个肌酸激酶磷酸化位点，它们与 PBEF/Visfatin 生理作用的发挥有密切关系。PBEF/Visfatin 基因位于染色体 7q22.1 和 7q31.33 之间，长 37.4KB，包含 11 个外显子和 10 个内含子。

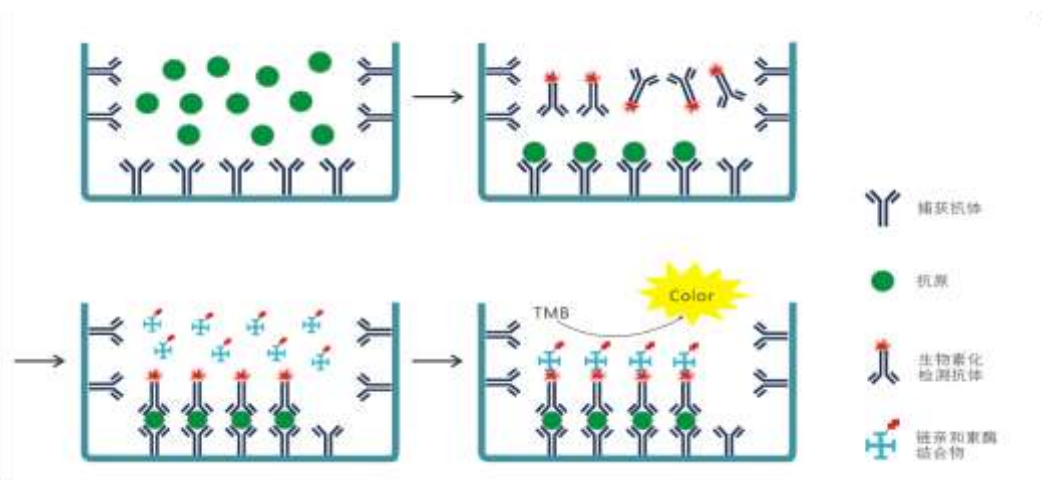
PBEF/Visfatin 源自 NAPRTase 家族。在细胞内和细胞外均能发挥作用并参与 NAD 的合成以及胰岛素受体激活。人类的 PBEF/Visfatin 有 491 个氨基酸编码但是没有信号肽序列，从它的 27-491 氨基酸来看，

人类的 PBEF/Visfatin 跟小鼠、猪以及犬类的相似度分别达到了 96%、97%和 96%。PBEF/Visfatin 能通过胰岛素受体（insulin receptor,IR）结合，诱导 IR，胰岛素受体底物的酪氨酸残基磷酸化，激活 Akt/蛋白激酶 B 和 Ras/丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）信号转导通路，在各种组织器官中发挥降血糖作用。在 B 细胞发育的早期，PBEF/Visfatin 与 IL-7 和 SCF 协同作用，促进前 B 细胞集落的形成，在 B 细胞的分化与成熟中发挥重要作用；PBEF/Visfatin 通过抑制半胱氨酸蛋白酶（Caspase）-8 和 Caspase-3 的活性，抑制中性粒细胞的凋亡。多种炎症刺激因子（LPS、IL-1B、TNF-a）等在体内外能显著增加 PBEF/Visfatin 的表达，尤其是中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞以及上皮细胞和内皮细胞。

总之：作为内源性炎性因子的一个新成员，PBEF/Visfatin 还与免疫细胞的信号转导、凋亡、物质代谢、凝血、炎症抑制、获得性免疫激活和组织修复等生理过程密切相关。

## 检测原理

本实验采用双抗体夹心 ELISA。用抗人 PBEF/Visfatin 单克隆抗体预包被酶标板，加入适度稀释的样本和标准品，其中的 PBEF/Visfatin 会与其单抗结合，洗去游离成分；加入生物素化的抗人 PBEF/Visfatin 抗体，抗人 PBEF/Visfatin 抗体与结合在单抗上的人 PBEF/Visfatin 结合而形成免疫复合物，洗去游离的成分；加入辣根过氧化物酶标记的亲合素，生物素与亲合素特异性结合，洗去未结合的酶结合物；加入显色剂，若反应孔中有 PBEF/Visfatin，辣根过氧化物酶会使无色的显色剂现蓝色；加终止液变黄。在 450nm 下测 OD 值，PBEF/Visfatin 浓度与 OD450 值之间呈正比，可通过绘制标准曲线计算出标本中 PBEF/Visfatin 浓度。



检测原理示意图

## 试剂盒组分

试剂盒组分	96 孔	48 孔	配制
1a 标准品	2 支	1 支	按说明书进行稀释
1b 标准品和标本稀释液	1 瓶	1 瓶	即用型
2a 浓缩生物素化抗体	2 支	1 支	按瓶签标识进行稀释
2b 生物素化抗体稀释液	1 瓶	1 瓶	即用型
3a 浓缩酶结合物（避光）	2 支	1 支	按瓶签标识进行稀释
3b 酶结合物稀释液	1 瓶	1 瓶	即用型
4 浓缩洗涤液 20×	1 瓶	1 瓶	按瓶签标识进行稀释
显色剂（避光）	1 瓶	1 瓶	即用型
终止液	1 瓶	1 瓶	即用型
抗体包被板条	8×12	8×6	即用型
封板胶纸	4 张	2 张	即用型
说明书	1 份	1 份	

如果您收到试剂盒后发现上表中有任何组分破损或缺失,请及时联系我司客服 400-7060-959 或 [tech@4abio.com](mailto:tech@4abio.com)。我们将及时为您解答相关问题。

## 储存条件

未启封的试剂盒	4℃保存, 请于保质期内使用。	
已启封或重新溶解的试剂	1b 标准品和标本稀释液	可以整盒放入 4℃储存 1 个月。 2a 浓缩生物素化抗体和 3a 浓缩酶结合物需现用现配。
	2a 浓缩生物素化抗体 (100×)	
	2b 生物素化抗体稀释液	
	3a 浓缩酶结合物 (避光 100×)	
	3b 酶结合物稀释液	
	4 浓缩洗涤液 20×	
	显色剂 (避光)	4℃或常温保存
	终止液	4℃或常温保存
	标准品	重溶后分装, -20℃存放一个月, 避免反复冻融。稀释后的标准品使用后应丢弃, 不得重复使用。
抗体包被板条	实验中不用的板条应立即放回包装袋中, 密封干燥 4℃保存。	

以上储存条件均要求在试剂盒保质期内。

## 其他实验材料 (不提供, 但可协助购买):

1. 酶标仪(450nm)
2. 高精度可调移液器及吸头: 0.5-10, 2-20, 20-200, 200-1000 $\mu$ l; 一次检测样品较多时, 最好用多通道移液器。
3. 自动洗板机或洗瓶
4. 37 $^{\circ}$ C温箱
5. 双蒸水或去离子水
6. 坐标纸
7. 量筒

## 注意事项

1. 试剂盒保存在2-8 $^{\circ}$ C, 除复溶后的标准品, 其它成分不可冷冻。
2. 浓缩生物素化抗体(2a)、浓缩酶结合物(3a)装量极少, 运输中颠簸和可能的倒置会使液体沾到管壁或瓶盖。使用前请离心处理以使附着于管壁或瓶盖的液体沉积到管底。
3. 为避免交叉污染请使用一次性吸头。
4. 终止液和显色剂具腐蚀性, 避免皮肤及粘膜直接接触, 一旦接触到这些液体, 请尽快用大量水冲洗。
5. 使用干净的塑料容器配制洗涤液, 使用前充分混匀试剂盒里的各种成份及样品。
6. 洗涤酶标板时应充分拍干, 不要将吸水纸直接放入酶标反应孔中吸水。
7. 不要用其它来源的试剂混合或替代该产品的组分, 不同批号的试剂盒组份不能混用, 请在有效日期内使用本产品。
8. 在试验中标准品和样本检测时建议作双复孔或三复孔, 加入试剂的顺序应一致, 以保证所有反应孔孵育的时间一样。
9. 充分混匀对反应结果尤为重要, 最好使用微量振荡器(使用最低频率进行振荡)。
10. 避免操作过程中酶标板干燥, 干燥会使酶标板上生物成分迅速失活, 影响实验结果。
11. 适当的稀释样品, 使样品值落在标准曲线范围内, 根据待测因子含量高、中、低的不同, 建议采用1:100, 1:10, 1:2稀释样品。如果样品OD值高于最高标准, 适当增加稀释度并重复检测。
12. 标准品稀释液、操作人、移液方式、洗涤方法、孵育时间及温度、试剂盒批次的不同均可能会导致结果的差异。
13. 此法可有效的消除可溶性受体、结合蛋白以及生物样品中的其他因素的干扰。

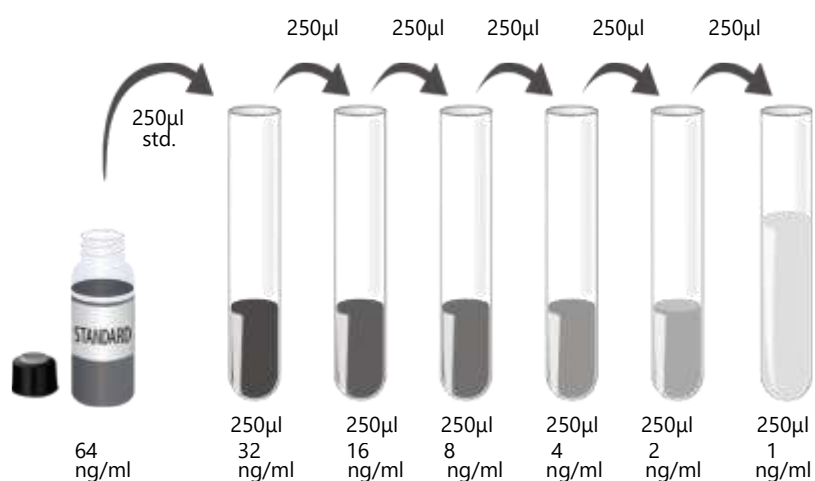
## 样本收集处理及保存方法

1. **血清**: 使用不含热原和内毒素的试管, 收集血液后, 室温凝血30min, 1000 $\times$ g离心10min, 小心分离血清。
2. **血浆**: 用EDTA、柠檬酸盐、肝素作为抗凝剂收集血浆, 收集后30min内以1000 $\times$ g离心15min去除颗粒。
3. **细胞上清液**: 1000 $\times$ g离心10min去除颗粒和聚合物。

- 保存:** 若样品不立即检测, 请将其按一次用量分装,  $-20^{\circ}\text{C}$ — $70^{\circ}\text{C}$ 保存, 避免反复冻融。尽量避免使用溶血或高血脂样本。如果血清中含有大量颗粒, 检测前离心或过滤去除; 室温下解冻, 请勿于 $37^{\circ}\text{C}$ 或更高的温度加热解冻。
- 稀释:** 可根据实际情况, 将标本做适当倍数稀释(建议做预实验, 以确定稀释倍数)。

## 试剂准备

- 提前30min从冰箱中取出试剂盒, 平衡至室温。
- 洗涤缓冲液:** 从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶, 这属于正常现象, 加热并轻轻摇晃使结晶完全溶解后再配制。将浓缩洗涤液用双蒸水稀释(1:20)。未用完的放回 $4^{\circ}\text{C}$ 。
- 标准品:** 加入标准品/标本稀释液(1b)0.5ml 至冻干标准品(1a)中, 待彻底溶解后, 静置 15 分钟混匀(浓度为 $64\text{ng/ml}$ ), 然后根据需要进行稀释, 见下图(建议标准曲线使用以下浓度:  $64$ 、 $32$ 、 $16$ 、 $8$ 、 $4$ 、 $2$ 、 $1$ 、 $0$   $\text{ng/ml}$ )。稀释的标准品不得重复使用, 未用完的标准品应按照一次用量分装后, 将其放在 $-20\sim-70^{\circ}\text{C}$ 贮存, 一次性使用, 避免反复冻融。
- 标准品稀释方法:**



- 生物素化抗体工作液:** 根据每孔需要 $100\mu\text{l}$ 来计算总的用量, 多配制 $100\sim 200\mu\text{l}$ 。以生物素化抗体稀释液(2b)稀释浓缩生物素化抗体(2a)(1:100)。最好现用现配。(稀释方法见下表)

所用板条数	浓缩生物素化抗体		生物素化抗体稀释液
12	110 $\mu\text{L}$	+	10890 $\mu\text{L}$
10	90 $\mu\text{L}$	+	8910 $\mu\text{L}$
8	70 $\mu\text{L}$	+	6930 $\mu\text{L}$
6	50 $\mu\text{L}$	+	4950 $\mu\text{L}$
4	33 $\mu\text{L}$	+	3267 $\mu\text{L}$
2	17 $\mu\text{L}$	+	1683 $\mu\text{L}$
1	9 $\mu\text{L}$	+	891 $\mu\text{L}$

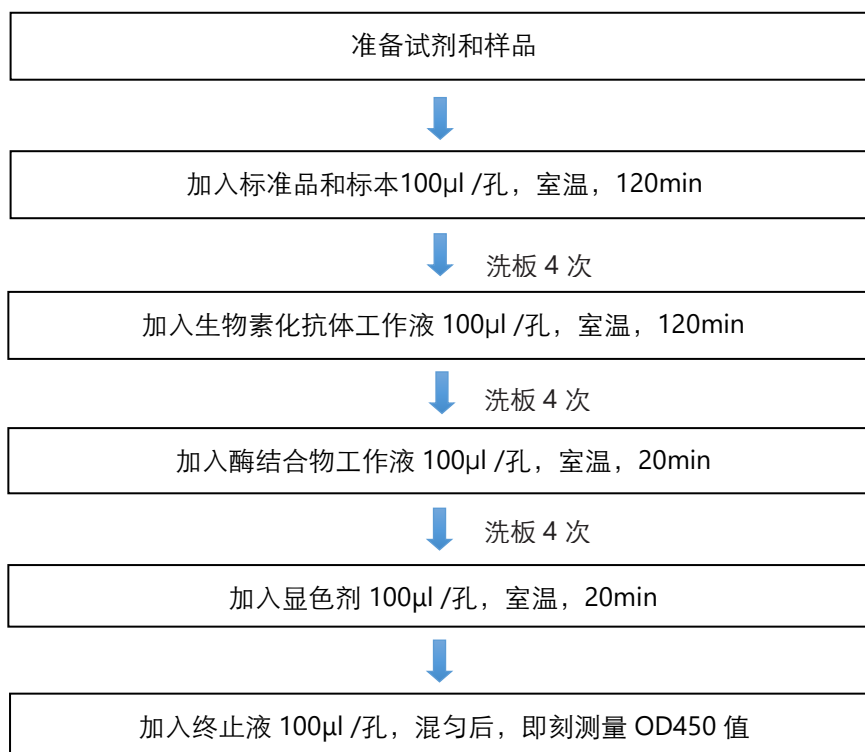
6. **酶结合物工作液**：以酶结合物稀释液(3b) 稀释浓缩酶结合物(3a)(1:100)。最好现用现配。（稀释方法见下表）

所用板条数	浓缩酶结合物		酶结合物稀释液
12	110 $\mu$ L	+	10890 $\mu$ L
10	90 $\mu$ L	+	8910 $\mu$ L
8	70 $\mu$ L	+	6930 $\mu$ L
6	50 $\mu$ L	+	4950 $\mu$ L
4	33 $\mu$ L	+	3267 $\mu$ L
2	17 $\mu$ L	+	1683 $\mu$ L
1	9 $\mu$ L	+	891 $\mu$ L

## 操作步骤

- 按照上述准备工作配制好各种溶液。
- 根据待测样品数量和标准品的数量决定所需的板条数，并增加1孔作为空白对照孔。分别将标本和不同浓度标准品(100 $\mu$ l/孔)加入相应孔中（零孔只加标准品/样本稀释液），用封板胶纸封住反应孔，室温孵育120分钟（空白对照孔除外）。充分混匀对反应结果尤为重要，要使用微量振荡器(最低频率700rpm)。
- 洗板4次：(1)自动洗板机：要求注入的洗涤液为350 $\mu$ l，注入与吸出间隔15-30秒。(2)手工洗板：甩尽孔内液体，每孔加洗涤液350 $\mu$ L，静置30秒后甩尽液体，在厚迭吸水纸上拍干。
- 加入生物素化抗体工作液(100 $\mu$ l/孔)。用封板胶纸封住反应孔，室温孵育120分钟（空白对照孔除外）。要使用微量振荡器(最低频率700rpm)。
- 洗板4次。
- 加入酶结合物工作液(100 $\mu$ l/孔)。用封板胶纸封住反应孔，室温孵育20分钟（空白对照孔除外）。要使用微量振荡器(最低频率700rpm)。
- 洗板4次。
- 加入显色剂100 $\mu$ l/孔，避光，室温孵箱孵育20分钟。

## 操作流程图



## 操作要点提示

1. 配制各种试剂时要充分混匀，但要避免产生大量泡沫，以免加样时加入大量的气泡，产生加样误差。
2. 为避免交叉污染，在加入不同浓度的标准品、不同样品、不同试剂时谨记及时更换吸头。
3. 为了确保准确的结果，在每次孵育前均需使用新封板胶纸封住反应孔。
4. 显色剂在添加之前，应保持无色，请勿使用已变为蓝色的显色溶液。最佳显色时间对标准曲线很重要，肉眼可见前 3-4 孔有梯度蓝色，后 3-4 孔差别不明显，零孔无蓝色出现即可终止。
5. 每次检测均要做标准曲线，根据样品待测因子的含量，适当稀释或浓缩样本，最好做预实验。

## 结果判断

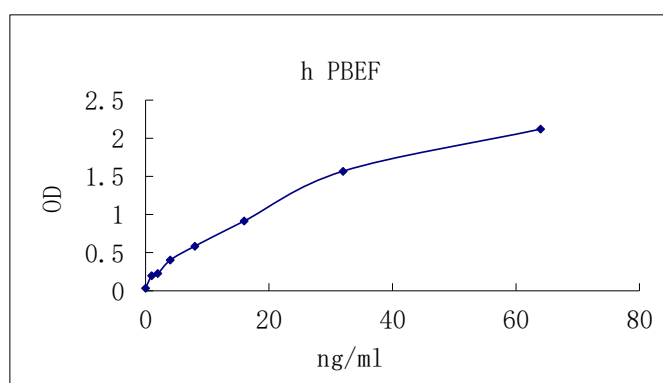
1. 每个标准品和标本的OD值应减去空白孔的OD值，如果做复孔，求其平均值。
2. 使用计算机软件以吸光度OD值为纵坐标(Y)，相应的标准品浓度为横坐标(X)，生成相应的标准曲线，样品待检物含量可根据其OD值由标准曲线换算出相应的浓度。
3. 若标本 OD 值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测，计算浓度时应乘以稀释倍数算标本含量。



#### 4. 参考数据:

标准品浓度(ng/ml)	OD值1	OD值2	平均值	矫正值
0	0.033	0.034	0.034	---
1	0.201	0.199	0.200	0.166
2	0.227	0.228	0.228	0.194
4	0.405	0.400	0.403	0.369
8	0.583	0.591	0.587	0.553
16	0.921	0.911	0.916	0.882
32	1.566	1.571	1.569	1.535
64	2.119	2.121	2.120	2.086

数据仅供参考，不同用户最佳显色时间会有所不同



本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线为准

## 结果重复性

板间，板内变异系数均<10%。

## 灵敏度

最低检测人 PBEF/Visfatin 剂量小于 0.5ng/ml。最低检出量测定方法：20 个零标准的平均 OD 值增加两个标准差，再计算相应的浓度。

## 特异性

此试剂盒可检测天然和重组的人 PBEF/Visfatin。

## 参考文献

- 1.Kitani,T,Okuno,S.,Fujisawa,H(2003) Growth phase-dependent changes in the subcellular localization of per-B-cell colony-enhancing factor,FEBSLett,544.,74-78
- 2.Martin,P.R.,Shea,R.J.,Mulks,M.H.(2001) Identification of a plasmid-encoded gene from *Haemophilus ducreyi* which confers NAD independence, *J. Bacteriol*,183,1168-1174
- 3.Ognjanovic,S.,Bao,S.,Yamamoto,S.Y.,Garibay-Tupas,J.,Samal,B.,Bryant-Green wood,G,D,(2001) Genomic organization of the gene coding for human-pre-B-cell colong enhancing factor and expression in human fetal membranes.*J.Mol.Endocrinol*.26,107-117
- 4.Ye,S,O.,Simon,B,A.,Maloney,J,P.,Zambelliweiner,A.,Gao,L.,Grant,A.,Easley,R,B.,Mcverry,B,J.,Tuder,R,M.,Standiford ,T.,Brower,R,G.,Barnes,K,C.,Garcia,J,G.(2005)Pre-B-cell colony-enhancing facto rasapotential novel biomarkerin acute lung injury,*Am,J.Respir,Crit.CareMed*.171,360-370
- 5.Stephens JM.,Vidal-Puig AJ,(2006) An update on visfatin/pre-B cell colony enhancing factor, an ubiquitously expressed, illusive cytokine that is regulated in obesity, *Curr Opin Lipidol*,17(2);128-131