



人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 定量分析酶联免疫检测试剂盒

本试剂盒仅供科研使用。用于体外定量检测人血清、血浆或细胞培养上清液中的胱抑素 C 浓度。**使用前请仔细阅读说明书并检查试剂组分是否完整。**如有产品包装破损或质量投诉，请在收到货一个月之内联系我们。

胱抑素 C 简介：

半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C，也称为 Cystatin-3 (CST3) 是一种真核细胞分泌的 II 型半胱氨酸蛋白酶抑制剂，属于 II 型半胱氨酸蛋白酶抑制剂家族。其分子量为 13kDa，由 120 个氨基酸组成。

Cystatin C 可抑制组织蛋白酶类，并通过抑制组织蛋白酶介导的肿瘤细胞入侵而起着肿瘤抑制因子的作用。此外，胞外实验证明，半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 会抑制正常和肿瘤细胞的 TGF- β 信号传导。半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 通过与 TGF- β II 型受体结合，抑制 TGF- β 蛋白的结合。

低分子量半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 蛋白近年来已经取代肌酐成为肾功能的生物标志物。

检测原理：

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法检测样本中胱抑素 C 的浓度。胱抑素 C 捕获抗体已预包被于酶标板上，当加入标本或参考品时，其中的胱抑素 C 会与捕获抗体结合，其它游离的成分通过洗涤的过程被除去。当加入辣根过氧化物酶标记的抗人胱抑素 C 抗体后，抗人胱抑素 C 抗体与胱抑素 C 接合，形成夹心的免疫复合物，其它游离的成分通过洗涤的过程被除去。最后加入显色剂，若样本中存在胱抑素 C 将会形成免疫复合物，辣根过氧化物酶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，读其 450nm 处的 OD 值，胱抑素 C 浓度与 OD₄₅₀ 值之间呈正比，通过参考品绘制标准曲线，对照未知样本中 OD 值，即可算出标本中胱抑素 C 浓度。

人胱抑素 C 定量分析酶联免疫检测试剂盒组成：

组分	规格 (96T/48T)
人胱抑素 C 预包被板	12条/6条
标准品稀释液	20ml/10ml
人胱抑素 C 标准品	2支/1支(冻干)*
抗体 HRP 结合物	10ml/5ml
浓缩洗涤液 20 \times	30ml/15ml
TMB 底物	10ml/5ml
中止液	5ml/3ml
封板胶纸	3/2张
说明书	1份

标本收集：

- 标本的收集请按下列流程进行操作：
 - 细胞上清标本离心去除悬浮物后即可；
 - 血清标本应是自然凝固后，取上清，避免在冰箱中凝固血液；
 - 血浆标本，推荐用 EDTA 的方法收集若待测样本不能及时检测，
 - 标本收集后请分装，冻存于 -20 $^{\circ}$ C，避免反复冻融。
- 血清标本不应添加任何防腐剂或抗凝剂；
- 标本应清澈透明，检测前样本中如有悬浮物应通过离心去除。
- 请勿使用溶血，高血脂或污染的标本检测，否则结果将不准确。

注：样本如需稀释请用标准品稀释液稀释后再检测。



注意事项:

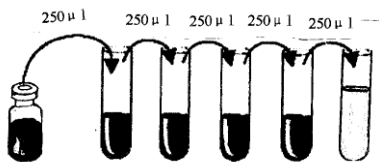
1. 试剂盒请保存在2~8℃。
2. 浓缩洗涤液因在低温下可能有结晶，请水浴加热使结晶完全溶解后再配制工作液。
3. 标准品复溶加样后，剩余部份请丢弃。
4. 底物请勿接触氧化剂和金属。
5. 加样时，请及时更换枪头，避免交叉污染。
6. 严禁混用不同批号的试剂盒组份。
7. 充分混匀对保证反应结果的准确性很重要，在加液后请轻轻叩击边缘以保证混匀。
8. 室温反应，请严格控制在25~28℃。
9. 洗涤过程是至关重要的，洗涤不充分会使精确度下降并导致结果误差较大。
10. 试验中标准品和样本检测时建议作双复孔。
11. 加样过程中避免气泡的产生。

样本的稀释:

1. 血清或血浆样本最少30倍稀释
2. 细胞上清及尿样本稀释倍数根据预实验确定;
3. 唾液样本最少20倍稀释;
4. 乳汁样本稀释倍数从40倍开始
5. 标准品稀释液如不够，可用新生牛血清稀释。

检测前准备工作:

1. 试剂盒自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于2~8℃保存。
2. 将浓缩洗涤液用双蒸水或去离子水稀释（1份加19份水）。
3. 将5×标准品稀释液用去离子水或双蒸水按1:4稀释成所需的体积；
4. 将检测抗体用检测抗体稀释液按标识提前10分钟配制成工作浓度；
5. 标准品：按标签复溶体积加入标准品稀释液复溶使使胰抑素C终浓度达到100ng/ml，室温反应，请严格控制在25~28℃，静置10~15分钟后轻轻混悬（建议抽吸几次）待彻底溶解，用标准品稀释液倍比梯度稀释后依次加入检测孔中。（标准曲线取七个点，最高浓度为100ng/ml，标准品稀释液直接加入作为0浓度。）下图为标准品稀释示意图。



洗涤方法:

自动洗板机或人工洗板：每孔洗涤液为300u1，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着在厚吸水纸上用力拍干。

实验过程需自备的材料:

1. 不同规格的加样枪及相应的枪头;
2. 酶标仪;
3. 自动洗板机;
4. 去离子水或双蒸水;

操作步骤:

1. 通过计算并确定一次性实验所需的板条数，取出所需板条放置在框架内，暂时用不到板条请放回铝箔袋密封，保存于4℃。
2. 建议设置本底校正孔，即空白孔，设置方法为该孔只加TMB显色液和中止液。每次实验均需做标准品对照并画出标准曲线。
3. 分别将稀释好的标本或不同浓度标准品（100u1/孔）加入相应孔中，用封板胶纸封住反应孔，室温（25~28℃）孵育120分钟。
4. 洗板5次，且最后一次置厚吸水纸上拍干。



5. 每孔加入HRP抗体结合物工作液(100u1/孔)。用封板胶纸封住反应孔，室温(25~28℃)孵育60分钟。
6. 洗板5次，且最后一次置厚吸水纸上拍干。
7. 加入显色剂TMB100u1/孔，避光室温(25~28℃)孵育20分钟。
8. 加入终止液50u1/孔，混匀后立即测量OD₄₅₀值。

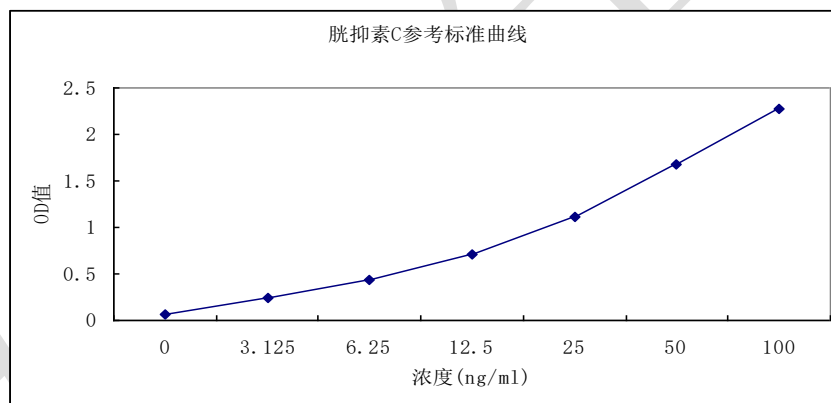
结果判断:

1. 复孔的值在20%的差异范围内结果才有效，复孔的值平均后可作为测量值。
2. 每个标准品或标本的OD值应减去本底校正孔的OD值。
3. 手工绘制标准曲线。以标准品浓度作横坐标，OD值作纵坐标，以平滑线连接各标准品的坐标点。通过标本的OD值可在标准曲线上查出其浓度。
4. 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。

典型数值和参考曲线

浓度ng/ml	典型OD值1	典型OD值2	OD平均值
0	0.061	0.068	0.0645
3.125	0.205	0.266	0.2355
6.25	0.381	0.485	0.433
12.5	0.641	0.778	0.7095
25	1.01	1.207	1.1085
50	1.471	1.883	1.677
100	2.028	2.512	2.27

人胱抑素C参考标准曲线



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标本含量。

灵敏度，特异性和重复性:

1. 灵敏度：多次重复结果表明，最小检出量为1.8ng/ml。
2. 特异性：与人的Cathepsin A, Cystatin A, Cystatin B等没有反应，与小鼠胱抑素C, 小鼠胱抑素A, 小鼠胱抑素B等没有交叉反应。
3. 重复性：板内，板间变异系数均<10%。

参考文献:

1. Deng A, Irizarry MC, Nitsch RM, Growdon JH, Rebeck GW: Elevation of cystatin C in susceptible neurons in Alzheimer's disease. Am J Pathol. 159: 1061-1068 (2001)
2. Tian S, Kusano E, Ohara T, Tabei K, Itoh Y, Kawai T, Asano Y: Cystatin C measurement and its practical use in patients with various renal diseases. Clin Nephrol. 48: 104-108 (1997)



上海传秋生物科技有限公司

English name

-
3. Dharnidharka VR, Kwon C, Stevens G: Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: a meta-analysis. *Am J Kidney Dis.* 40: 221-226 (2002)
 4. Risch L, Blumberg A, Huber A: Rapid and accurate assessment of glomerular filtration rate in patients with renal transplants using serum cystatin C. *Nephrol Dial Transplant.* 14: 1991-1996 (1999)

上海传秋生物