

Code No. MK107

研究用

---

**TaKaRa**

Laminin EIA Kit

---

说明书

# 目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 试剂盒外所需主要试剂及器材	1
● 保 存	1
● 使用目的	2
● 使用方法	2
● 性 能	3
● 测定时的基本资料	5
● 使用注意事项	8
● 参考文献	8

## ● 制品说明

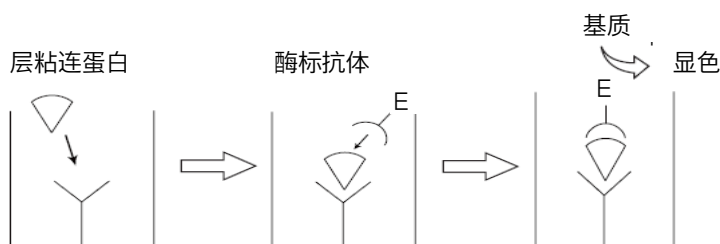
层粘连蛋白(laminin, LN)是一类构成细胞基膜的高分子量糖蛋白。层粘连蛋白在细胞粘着、细胞运动、细胞间信号传递及正常细胞和癌细胞的增殖、分化、癌细胞的转移及神经的生长和再生中起着关键作用。层粘连蛋白有三个亚单位, LN 分子由一条重链( $\alpha$ )和二条轻链( $\beta$ 、 $\gamma$ )借二硫键交联而成,在电子显微镜下观察其外形呈十字形。目前已证实层粘连蛋白有5条A链,3条 $\beta$ 链和2条 $\gamma$ 链,可形成11种层粘连蛋白。这些层粘连蛋白与胶原蛋白、肝素和蛋白多糖等其它成分结合在一起构成基膜。

我们已知各种培养细胞可产生层粘连蛋白,但从高浸润性癌细胞中分离出层粘连蛋白受体后,就可以认为癌细胞的转移首先要附着于基底膜的层粘连蛋白,随着癌细胞的进一步转移基底膜受损,向血液中释出层粘连蛋白,因此层粘连蛋白作为基底膜受损程度的标记物逐渐受到重视。随后不仅在血液中,尿液中也发现了层粘连蛋白片段<sup>14)</sup>,因此需要更高灵敏度的检测方法。

本制品使用了可识别人层粘连蛋白(LN) $\gamma$ 链的特异性单克隆抗体。为了检测体液中的层粘连蛋白,本制品检测体系可以捕获血液和尿液中的层粘连蛋白并对其进行定量,操作简便、快速。本制品可对人和兔进行检测。本制品不与牛抗原发生交叉反应,含胎牛血清的细胞培养上清液可直接作为检测样品。

本制品已将抗体包被到96孔板中,便于操作。仅需2小时30分钟即可完成96孔样品的检测。

### 检测原理图



## ● 制品内容

(1) Antibody Coated Microtiterplate (96 wells : 8 wells $\times$ 12 strips) 包被了 human Laminin 的鼠源单克隆抗体板	1 plate
(2) Antibody-POD Conjugate (Lyophilized) 含冻干的辣根过氧化物酶(POD)连接的 human Laminin 鼠源单克隆抗体	for 11 ml
(3) Standard 含冻干的 human Laminin 320 ng	for 1 ml
(4) Sample Diluent 25% Block Ace™- containing PBS (含有防腐剂)	11 ml $\times$ 2
(5) Substrate Solution (TMBZ) 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine solution	12 ml

## ● 试剂盒外所需主要试剂及器材

- Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid (Code No. MK021)  
洗液 (10  $\times$  PBS: 50 ml  $\times$  5 支、Tween 20: 3 ml)和反应终止液 (60 ml)。  
\* 本制品是不含 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 的过氧化物酶反应终止液。
- 反应终止液也可以使用 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>。使用 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 时要注意。  
注意: 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 具有腐蚀性, 接触到皮肤会导致皮肤溃烂。接触到手和粘膜时, 立刻用大量流水冲洗后, 按照医嘱处理。
- 移液器、微量移液枪及枪头
- 酶标仪 (在 450 nm 处测定吸光值可达 3.5)

## ● 保 存: 4°C。

## ● 使用目的

用于人、兔细胞培养上清液和血液、尿液中完整的层粘连蛋白和层粘连蛋白片段的定量。

注：本制品用于研究，不可用于疾病的诊断。

## ● 使用方法

### 1. 检测样品的制备方法

检测样品尽可能在检测时制备，如果已制备的检测样品要在 12 小时以后检测时，需冷冻保存。人血清和血浆作为检测样品时，将人血清和血浆用(4) Sample Diluent 稀释 6~10 倍后再进行检测。要注意溶血血液作为检测样品时检测值会偏高。

请参照后面的检测数据选择抗凝剂和采血条件。

人尿液作为检测样品时，除异常高值外可对尿液原液直接进行检测。但检测时二者均需要进行肌酐校正。要注意尿潜血的检测值会偏高。

### 2. 试剂的准备

- 抗体包被板 ((1) Antibody Coated Microtiterplate)

使用前放置至室温后再开封。

- 酶标抗体工作液

在(2) Antibody-POD Conjugate 中加入 11 ml 蒸馏水使其溶解。

溶解后 4℃保存 1 周性能稳定。1 周以上要-20℃保存。-20℃保存 1 个月性能稳定，且只能冻融一次。

- LN 标准液

在 LN 标准品(3) Standard 中加入 1 ml 蒸馏水后使其溶解，制备成 320 ng/ml 的 LN 标准液。用(4)Sample Diluent 将 320 ng/ml 的 LN 标准液梯度稀释至 160、80、40、20、10、5 ng/ml。

0 浓度使用(4)Sample Diluent。LN 标准液(320 ng/ml)可-20℃保存 1 个月性能稳定，且只能冻融一次。

- 基质液 (5) Substrate Solution (TMBZ)

使用前，放置至恢复室温后，可直接使用。使用前确认基质液颜色是否变为深蓝色。基质液与金属离子反应会显色，注意不要混入自来水。分多次使用时，按照所需量提前分装。

- 反应终止液(Stop Solution)

可直接使用 Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid (Code No. MK021)中的 Stop Solution。本制品是不含 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>的过氧化物酶反应终止液。

注：溶液粘性大，因此，添加后要使用 Plate mixer 充分混合。

- PBS 洗液 (含 0.1% Tween20)

将 Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid (Code No. MK021)中的 10×PBS (50 ml)用蒸馏水稀释至 500 ml 后，再添加 500 μl Tween20，充分混匀后作为 PBS 洗液。

### 3. 操作方法

- 测定时进行 N=2 的平行反应。

- 试剂盒中的各试剂及检测样品使用前室温放置，混合时避免产生气泡，混匀后再使用。

- 在 96 孔抗体包被板的各孔中分别加入 100 μl 各稀释浓度的 LN 标准液和检测样品(N=2)，室温(20~30℃)反应 1 小时。此时建议将样品预先准备于另一 96 孔板中，用 8 孔排枪快速地将抗体包被板中(5 分钟内)。为提高检测值的可信度，应将梯度稀释的 LN 标准液添加在 96 孔板的第 1 列和第 12 列中(第一反应)。
- 弃除反应液，用含 0.1% Tween20 的 PBS 清洗 3 次后，用 8 孔排枪在各孔中分别加入 100 μl 的酶标抗体工作液，室温(20~30℃)反应 1 小时(第二反应)。
- 弃除反应液，用含 0.1% Tween20 的 PBS 清洗 4 次后，用 8 孔排枪在各孔中分别加入 100 μl 的(5) Substrate Solution (TMBZ)，室温(20~30℃)反应 10~15 分钟(第三反应)。
- 按照 Substrate Solution (TMBZ)的添加顺序，在各孔中分别加入 100 μl 的 Stop Solution 终止

反应后充分混合。

e. 酶标仪在 450 nm 测定吸光度值。反应终止后 1 小时内显色稳定。

f. 在半对数坐标纸上作图，X 轴表示各 LN 标准液的浓度，Y 轴表示吸光度值，绘制标准曲线后，根据检测样品的吸光度值可查出相应的 LN 浓度。

## ● 性能

### 1. 标准曲线 (Laminin EIA Kit)

下面是具有代表性的标准曲线例。为了获得准确的检测结果，测定时需绘制标准曲线。

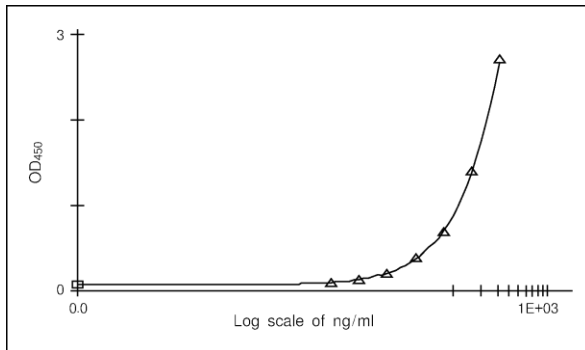
最低检出灵敏度：5.0 ng/ml

Curve Fit: 4-Parameter

Corr. Coeff : -1.00

$$y = (A - D) / (1 + (x/C)^B) + D$$

A=0.0787 B=1.15 C=1.10E+03 D=13.6



Laminin(ng/ml)	320	160	80	40	20	10	5	0
A450 nm	2.712	1.418	0.700	0.385	0.215	0.145	0.104	0.075

(显色时间：15 分钟)

### 2. 再现性

同时再现性

将人血清稀释为 3 种浓度后作为对照进行再现性实验。

HLN EIA 同时再现性 (n=16)

样品 (n=16)	平均值 (ng/ml)	标准偏差 (ng/ml)	C.V.值 (%)
Control A	121.3	6.3	5.2
Control B	36.6	1.5	4.0
Control C	11.0	0.6	5.7

日差再现性

将 3 种浓度的对照进行了 3 天定量的再现性实验。

PIP EIA 日差再现性 (n=3)

样品 (n=3)	平均值 (ng/ml)	标准偏差 (ng/ml)	C.V.值 (%)
Control A	120.4	2.9	2.4
Control B	36.8	0.12	0.3
Control C	10.4	0.54	5.1

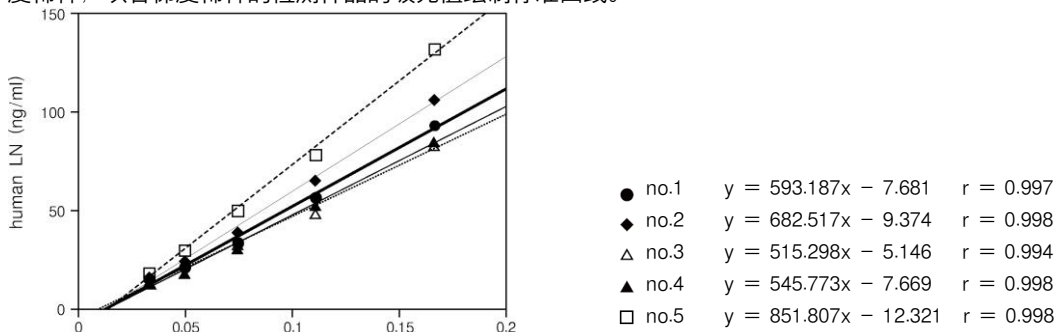
### 3. 添加回收试验

加入等量的各浓度检测样品后，通过理论值和实测值对回收率进行了计算。

样品 A (ng/ml)	样品 B (ng/ml)	A+B 实测值 (ng/ml)	A+B 理论值 (ng/ml)	回收率 (%)
198.6	0.0	103.0	99.3	103.7
198.6	198.6	200.0	198.6	100.7
198.6	97.3	145.4	148.0	98.3
198.6	45.6	121.8	122.1	99.8
198.6	26.9	110.8	112.8	98.3
198.6	9.8	104.1	104.2	99.9
97.3	0.0	50.7	48.7	104.2
97.3	97.3	96.9	97.3	99.6
97.3	45.6	71.4	71.5	99.9
97.3	26.9	56.4	62.1	90.8
97.3	9.8	51.4	53.6	96.0
45.6	0.0	25.1	22.8	110.1
45.6	45.6	46.1	45.6	101.1
45.6	26.9	35.8	36.3	98.8
45.6	9.8	30.7	27.7	110.8
26.9	0.0	13.3	13.5	98.9
26.9	26.9	24.4	26.9	90.7
26.9	9.8	18.1	18.4	98.6

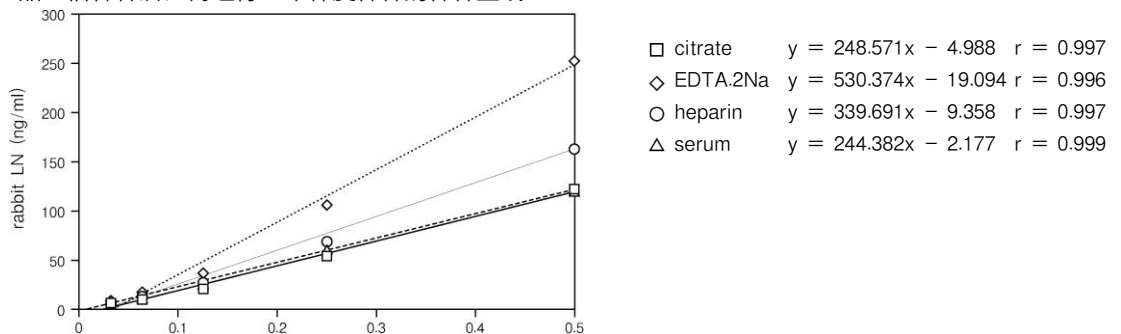
#### 4. 稀释直线性

下图是 5 种人血清样品的稀释直线。首先在 150 μl 检测样品中加入 750 μl Sample Diluent 对样品进行 6 倍稀释。然后在 6 倍稀释的 300 μl 检测样品中加入 150 μl Sample Diluent 进行 1.5 倍的梯度稀释，以各梯度稀释的检测样品的吸光值绘制标准曲线。



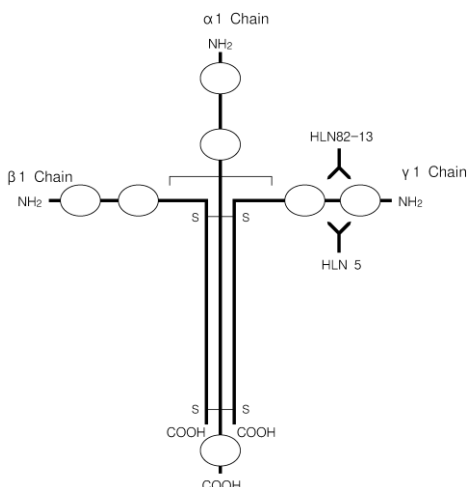
#### 5. 血液中加入不同抗凝剂时的测定值比较和稀释直线（正常兔子的实验例）

下图是在同一只兔子（日本白色种 10 周龄 雄性）同时采取的血液样品中加入不同抗凝剂，对血液样品 2 倍稀释后，再进行 2 个梯度稀释的稀释直线。



## ● 测定时的基本资料

### 1. 抗体特异性



固相抗体 HLN82-13 · 酶标抗体 HLN5 的识别位点在  $\gamma$  1 链 N 末端分子量为 42 kDa 的区域。与尿液中分离的 LN 抗原解析序列结果一致。

### 2. 尿液中 HLN 的定量实验例

个人尿液 LN 的日差变化

\*层粘连蛋白 (ULN) 和纤维连接蛋白 (UFN) 测定时: 尿液液。

\*E-钙粘蛋白 (UEcad) 测定时: 9 倍稀释的尿液。

\*采尿时间: 白天的随机尿

\*使用以往制品 (Code No. MK015、MK007、MK017; 已终卖)。同时也对肌酐进行了测定。

		ULN (ng/ml)	Cr (g/l)	ULN/Cr ( $\mu$ g/g·Cr)	UFN/Cr ( $\mu$ g/g·Cr)	UEcad(/Cr) (mg/g·Cr)
1. female	day 1	75.6	1.264	59.8	76.8	2.82
	day 2	42.5	1.004	42.3	66.2	3.66
	day 3	36.1	0.605	59.7	75.4	4.33
	day 4	94.8	1.514	62.6	134.4	2.69
	day 5	81.6	2.346	34.8	57.5	3.42
	day 6	93.1	1.915	48.6	48.9	4.20
	day 7	87.3	1.313	66.5	99.8	3.89
	day 8	61.4	0.483	127.2	106.6	6.08
2. female	day 1	41.0	1.182	34.7	19.7	1.11
	day 2	64.2	2.045	31.4	17.6	0.59
	day 3	30.3	1.594	19.0	10.7	0.49
	day 4	66.8	1.565	42.7	21.4	0.20
	day 5	48.4	1.814	26.7	9.1	0.40
	day 6	63.5	2.562	24.8	20.1	0.22
	day 7	55.6	2.031	27.4	7.4	0.23
	day 8	60.8	1.579	38.5	14.8	0.33
3. male	day 1	54.3	1.195	45.4	58.5	0.73
	day 2	9.6	0.403	23.9	0.0	0.17
	day 3	61.5	1.016	60.5	56.4	0.86
	day 4	64.0	1.397	45.8	78.9	0.93
	day 5	16.8	0.422	39.9	5.7	1.37
	day 6	43.3	0.561	77.2	18.2	0.14
	day 7	53.4	1.466	36.4	21.6	1.17
	day 8	52.5	0.645	81.4	42.9	1.61

个人 1 天内的 LN 和其它尿蛋白的总排泄量

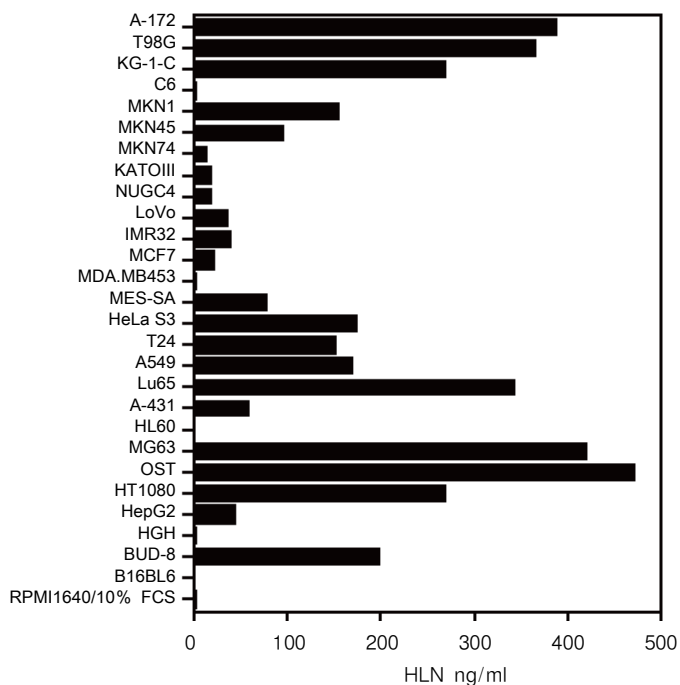
	Urine (ml)	ULN (ng/ml)	Cr (g/l)	ULN/Cr ( $\mu\text{g/g.Cr}$ )	UFN/Cr ( $\mu\text{g/g.Cr}$ )	UEcad (/Cr) (mg/g.Cr)
4. male	270	114.8	1.760	65.2	113.4	0.40
	525	54.2	1.100	49.3	172.6	0.26
	70	101.7	1.489	68.3	44.7	1.04
	570	36.0	0.897	40.1	12.5	0.47
5. female	80	83.3	1.331	62.6	13.1	0.94
	100	135.0	1.441	93.7	28.0	0.80
	180	59.7	1.478	40.4	15.1	0.58
	200	52.8	0.974	54.2	46.8	1.52
	180	77.8	1.466	53.1	26.2	0.63
6. male	350	22.6	0.584	38.7	40.8	0.85
	470	11.8	0.481	24.6	24.3	1.32
	370	27.7	0.676	41.0	17.9	0.53
	180	62.5	1.548	40.4	49.5	0.50
	130	79.2	1.890	41.9	15.9	0.31
7. male	250	94.7	1.718	55.1	35.3	1.04
	150	117.8	2.759	42.7	53.9	1.47
	160	89.2	1.579	56.5	72.6	2.43
	175	163.9	2.400	68.3	59.1	1.43
	175	118.6	1.844	64.3	51.6	1.33

3. 培养上清液中的 HLN 定量例

各种培养细胞在含血清的培养基中培养后，使用本试剂盒对上清中的 HLN 进行的测定。

使用本试剂盒测定时，胎牛血清存在条件下也不会影响检测结果。

细胞株





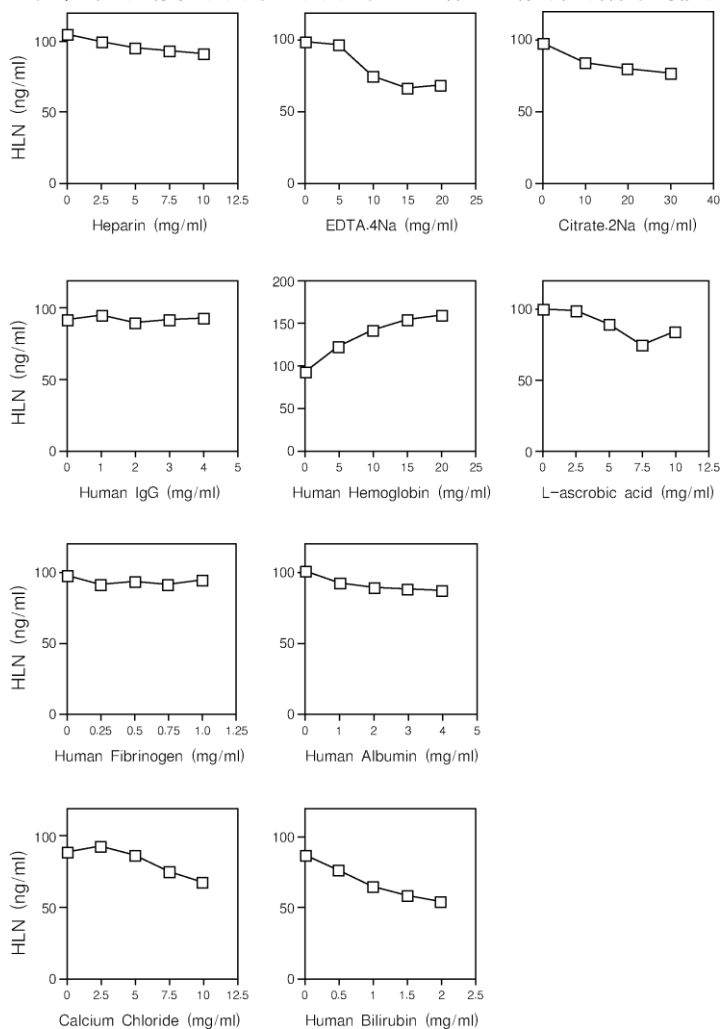
A-172: 人胶质母细胞瘤  
 T98G: 人胶质瘤  
 KG-1-C: 人神经胶质瘤  
 C6: 大鼠神经胶质瘤  
 MKN1: 人胃癌  
 MKN45: 人胃癌  
 MKN74: 人胃癌  
 KATOIII: 人胃癌  
 NUGC4: 人胃癌  
 LoVo: 人结肠腺癌  
 IMR32: 人神经母细胞瘤  
 MCF7: 人乳癌  
 MDA.MB453: 人乳癌  
 MES-SA: 人子宫癌  
 HeLa S3: 人子宫癌

T24: 人膀胱癌  
 A549: 人肺癌  
 Lu65: 人肺癌  
 A-431: 人表皮癌  
 HL60: 人白血病细胞  
 MG63: 人骨肉瘤  
 OST: 人骨肉瘤  
 HT1080: 人纤维肉瘤  
 HepG2: 人肝癌  
 HGH: 人心脏细胞  
 BUD-8: 人正常皮肤细胞  
 B16BL6: 小鼠黑色素瘤  
 RPMI1640/10% FCS: 培养基

#### 4. 共存物的影响

在 4 体积的检测样品中添加 1 体积的共存物后对反应体系的影响。

表中所示共存物浓度为终浓度。要注意溶血血清对检测体系可能有影响。



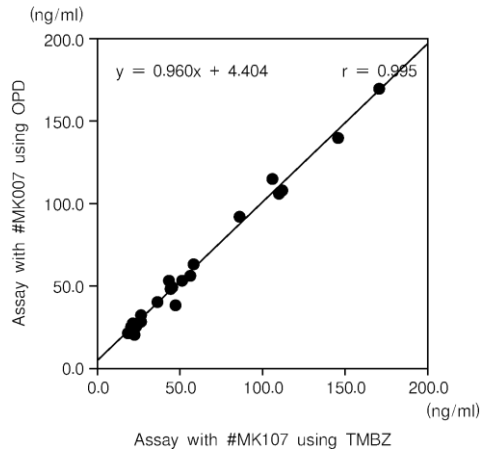
## 5. 与以往制品的相关性

使用以往的用现配型试剂盒 (Code No. MK007: 已终卖) 和本试剂盒 (Code No. MK107) 对 22 例血清样品进行了测定。

相关数据

$$y = 0.960x + 4.404$$

$$r = 0.995$$



## ● 注意事项

1. 请使用同一批号的试剂盒和试剂，不同批号的试剂盒组份和试剂不要混用。
2. 试剂在保存或反应时要避免光照。
3. (5) Substrate Solution (TMBZ) 和 Stop Solution 不能使用带有金属配件的移液枪。
4. (5) Substrate Solution (TMBZ) 和 Stop Solution 避免直接接触手和粘膜。
5. 避免使用着色的 Substrate Solution (TMBZ)。
6. 反应时由于受反应时间和温度的影响，每次测定应同时绘制标准曲线。
7. 使用血液样品时要充分注意。

## ● 参考文献

- 1) Kleinman, H. K. *et al* (1985) *J. Cell Biochem.* **27**, 317.
- 2) Burgeson, R. *et al* (1994) *Matrix Biology* **14**, 209–211.
- 3) Beck, K. *et al* (1990) *FASEB J.* **4**, 148.
- 4) Timpl, R. (1989) *Eur. J. Biochem.* **180**, 487.
- 5) Rao, C. N. *et al* (1989) *Biochemistry* **28**, 7476–7486.
- 6) Sonnenberg, A. *et al* (1988) *Nature* **336**, 487.
- 7) Timpl, R. *et al* (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 9933.
- 8) Wewer, U. *et al* (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 12654.
- 9) Alitalo, K. *et al* (1980) *Cell* **19**, 1053.
- 10) Kropf, J. *et al* (1988) *Clin. Chem.* **34**, 2026.
- 11) Niemelä, O. *et al* (1985) *Eur. J. Clin. Invest.* **15**, 132.
- 12) Kropf, J. *et al* (1991) *Clin. Chem.* **37**, 30.
- 13) Brocks, D. G. *et al* (1986) *Clin. Chem.* **32**, 787.
- 14) Katayama, M. *et al* (1992) *Br. J. Cancer* **65**, 509–514.

**注意**

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经TAKARA BIO INC.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站[www.takara-bio.com](http://www.takara-bio.com)。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考TAKARA BIO INC.网站。为正确使用Takara产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

**技术咨询热线：**

0411-87641685, 87641686  
4006518761, 4006518769

**TAKARA BIO INC.**

URL: <http://www.takara.com.cn>