

小鼠脑源性神经营养因子酶联免疫吸附测定试剂盒

产品编号：MA0770 规格：96次

产品内容

| 产品组成 | 体积/数量 |
|--------------------|------------------|
| 小鼠 BDNF 预包被板 | 8 孔条×12 个 |
| 样品稀释液 | 30mL |
| 重组小鼠 BDNF 标准品(冻干) | 2 支(10ng/支) |
| 生物素标记小鼠 BDNF 抗体 | 130 μL(效价 1:100) |
| 抗体稀释液 | 12mL |
| 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 | 12mL |
| 浓缩洗涤液(25×) | 30mL |
| 显色剂 TMB | 10mL |
| 终止液 | 10mL |
| 封板胶纸 | 4 张 |

产品简介

本试剂盒采用双抗体夹心ELISA法，用于检测样品中小鼠BDNF的浓度。小鼠BDNF捕获抗体已经预包被于酶标板上，当加入样品或标准品时，其中的小鼠BDNF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小鼠BDNF抗体后，抗小鼠BDNF抗体与小鼠BDNF结合，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，若样品中存在小鼠BDNF，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450nm处的OD值，小鼠BDNF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，即可计算出样品中小鼠BDNF的浓度。

脑源性神经生长因子(BDNF, brainderivedneurotrophicfactor)，其成熟形式有119个氨基酸，分子量13KDa。BDNF在所有哺乳动物系中蛋白序列高度保守，和其它神经生长因子相似，其中和NGF有52%的同源性。BDNF在体液中以非共价键二聚体的形式存在，分子中有六个胱氨酸残基，可以形成三个二硫键。纤维母细胞、星型胶质细胞、各种神经元、巨核细胞/血小板、schwann细胞(损伤附近)、某些肌细胞都表达BDNF。BDNF在血浆的表达处于pg/mL水平，在血清的表达处于ng/mL水平，显然和血小板释放BDNF有关。BDNF有两种受体，一种是低亲和力NGFR，另一为TrkB。BDNF的功能特别广泛，在发育期神经的生长、分化成熟、存活期及突触发育都起重要作用，在成年期最重要的作用是对神经元的保护作用。



产品参数：

| | |
|------|------------------------|
| 检测范围 | 31.25pg/mL~2,000pg/mL |
| 敏感性 | 15pg/mL |
| 特异性 | 系统和其它因子无交叉反应 |
| 样本类型 | 小鼠血清、血浆、体液、组织匀浆或细胞培养上清 |

使用方法

（一）样品制备

1.根据样品种类选择相应的处理方法：

（1）细胞上清：将细胞培养上清液100~500×g离心5min，去除悬浮物后即可。

（2）血清样品：将全血在室温下静置0.5~2h，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，10min)，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；

（3）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℃，1,000~2,000×g，10min)，注意请勿吸取沉淀，制备好的血浆需置于冰上待用；

（4）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℃，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.稀释样本

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20~200ng/mL范围内，一般按1:100稀释，即向297 μL样品稀释液中加入3 μL样品；

（2）待测因子含量在2~20ng/mL范围内，一般按1:10稀释，即向225 μL样品稀释液中加入25 μL样品；

（3）待测因子含量在31.25~2,000pg/mL范围内，一般按1:2稀释，即向100 μL样品稀释液中加入100 μL样品；

（4）待测因子含量≤31.25pg/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。

（二）检测准备工作



3.试剂盒自4℃冰箱取出后，请置于室温平衡20min；如从-20℃取出，各组分需彻底融化后再平衡20min；检测完成后，剩余试剂请及时置于4℃或-20℃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.重组小鼠BDNF标准品的稀释和使用(在使用前2h内准备，室温操作，请严格控制在25~28℃)

(1) 配制10ng/mL标准品：取1mL样品稀释液加入标准品管内，盖好后静置15min以上，然后反复颠倒/搓动以助溶解；

(2) 配制2,000pg/mL标准品：取200μL 10ng/mL的标准品加入有800μL样品稀释液的EP管中，混匀，做上标记；

(3) 按下表将2,000pg/mL标准品用样品稀释液进行倍比梯度稀释。(最高浓度为2,000pg/mL，将标准品稀释液作为浓度0pg/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 | 1000 | 2,000 |
| B | 300 | 300(从A管取出) | 1,000 |
| C | 300 | 300(从B管取出) | 500 |
| D | 300 | 300(从C管取出) | 250 |
| E | 300 | 300(从D管取出) | 125 |
| F | 300 | 300(从E管取出) | 62.5 |
| G | 300 | 300(从F管取出) | 31.25 |
| H | 300 | 0 | 0 |

注意：标准品复溶加样后，剩余部分请丢弃。

6.准备生物素标记小鼠BDNF抗体工作液

(1) 按每孔需添加100μL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1μL生物素标记小鼠BDNF抗体添加99μL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1h内准备)

(1) 按每孔需添加100μL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100~200μL)；

(2) 按1μL酶复合物添加99μL酶复合物稀释液的比例配制工作液，轻轻混匀。

(三) 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℃或-20℃。

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(100μL/孔)分别加入相应孔中，用封板胶纸封住反应孔，37℃孵育90min。

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10min，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小鼠BDNF抗体工作液(100 μ L/孔)，用封板胶纸封住反应孔，37 $^{\circ}$ C孵育60min。

12.洗板5次，每孔1 \times 洗涤液用量为300 μ L，注入与吸出间隔15~30s，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 μ L/孔)，用封板胶纸封住反应孔，37 $^{\circ}$ C避光孵育30min。

14.洗板5次，方法同步步骤12；

15.加入显色剂TMB(100 μ L/孔)，用封板胶纸封住反应孔，避光37 $^{\circ}$ C反应10~25min。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 μ L/孔)，混匀后即刻使用酶标仪测量OD450，同时设定540nm或570nm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10min内完成。

(四) 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；

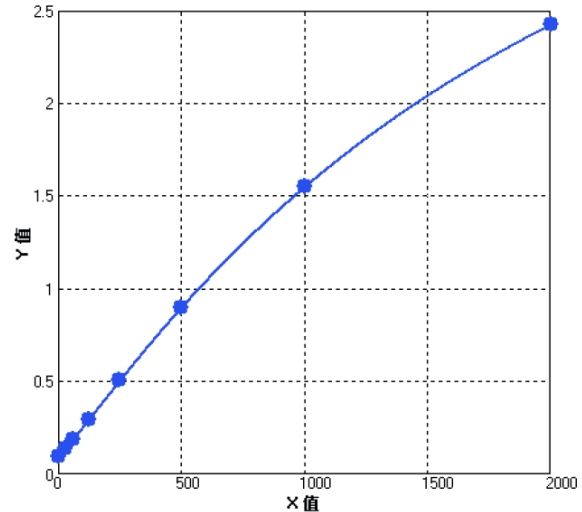
②若样品OD值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测，计算浓度时应乘以稀释倍数。

标准曲线范例

小鼠BDNF参考标准曲线



| 标准品浓度 | O.D. |
|-------------|-------|
| 0 pg/mL | 0.096 |
| 31.25 pg/mL | 0.141 |
| 62.5 pg/mL | 0.191 |
| 125 pg/mL | 0.295 |
| 250 pg/mL | 0.506 |
| 500 pg/mL | 0.900 |
| 1,000 pg/mL | 1.550 |
| 2,000 pg/mL | 2.425 |



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。

保存条件

2~8℃保存，自生产之日起6个月有效；长期储存请置于-20℃，自生产之日起12个月有效。

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。

J240101

