人β神经生长因子酶联免疫吸附测定试剂盒

产品编号：MA0791 规格：96 次

产品内容

产品组成	体积/数量
人β-NGF 预包被板	8 孔条×12 个
样品稀释液	30mL
重组人β-NGF 标准品(冻干)	2 支(10ng/支)
生物素标记人β-NGF 抗体	130μL(效价 1:100)
抗体稀释液	12mL
酶复合物(HRP 标记的链霉亲和素)	130μL(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，用于检测样品中人β-NGF的浓度。人β-NGF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β-NGF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β-NGF抗体后，抗人β-NGF抗体与人β-NGF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β-NGF，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，人β-NGF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β-NGF的浓度。

神经生长因子(NGF)最初分离出来时是非共价三聚体蛋白，分别由α、β、γ三个亚基组成，其中β亚基，也叫β-NGF，具有完整的NGF生物学活性。β-NGF是以由两条成熟多肽(120个氨基酸)组成的同质二聚体形式分泌。人的β-NGF蛋白与小鼠、大鼠有90%的同源性。

β-NGF已被证明是强效的神经营养因子，在外周神经感觉神经元和交感神经系统的发育中起到重要的作用。此外，β-NGF还是一个多功能的细胞因子，其在免疫调节中扮演着重要的角色，IL-1、TNF-α、PDGF和TGF-β等细胞因子都能够刺激星形胶质细胞NGF的分泌增强。NGF也能刺激人B淋巴细胞的生长和分化，同时小鼠NGF具有抑制腹膜中性粒细胞调亡的作用。

产品参数：

检测范围	31.25pg/mL~2,000pg/mL
敏感性	14pg/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

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297μL样品稀释液中加入3μL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225μL样品稀释液中加入25μL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100μL样品稀释液中加入100μL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.重组人B-NGF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200μL10ng/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.准备生物素标记人β-NGF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生物素标记人β-NGF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人β-NGF抗体工作液(100μL/孔)，用封板胶纸封住反应孔，37℃孵育60min。

12.洗板5次，每孔1×洗涤液用量为300μL，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(100μL/孔)，用封板胶纸封住反应孔，37℃避光孵育30min。

14.洗板5次，方法同步骤12；

15.加入显色剂TMB(100μL/孔)，用封板胶纸封住反应孔，避光37℃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(100μL/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：

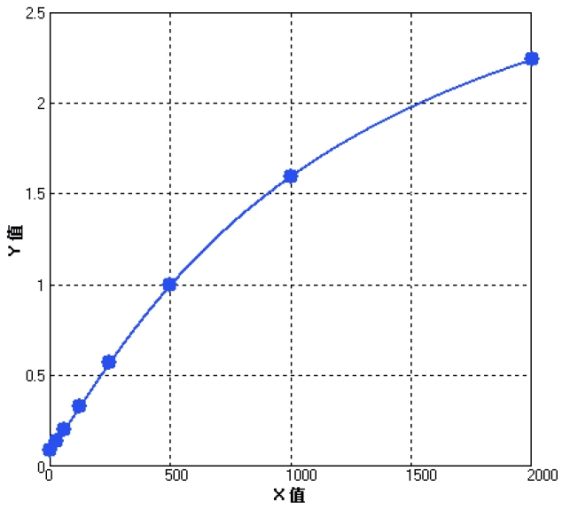
①复孔OD值在20%的差异范围内结果才有效，复孔OD值取平均后可作为测量值；

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

人β-NGF参考标准曲线

标准品浓度	O.D.
0 pg/mL	0.091
31.25 pg/mL	0.142
62.5 pg/mL	0.203
125 pg/mL	0.328
250 pg/mL	0.574
500 pg/mL	0.999
1,000 pg/mL	1.598
2,000 pg/mL	2.238



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