



INSTRUCTION MANUAL



FOR RESEARCH USE ONLY; NOT FOR THERAPEUTIC OR DIAGNOSTIC APPLICATIONS!

PLEASE READ THROUGH ENTIRE procedure BEFORE BEGINNING!



ZCIBIO Technology Co.,Ltd

☎ 咨询热线: +86-21-65681082

📧 技术支持: zcibio@163.com

仅供科研使用，不得用于临床检验。

极长链脂肪酸 (VLCFA) 定量检测试剂盒 (ELISA) 说明书

【产品名称】

通用名称：极长链脂肪酸 (VLCFA) 检测试剂盒 (ELISA)

英文名称：VLCFA ELISA KIT

货号：ZC-55897-J

【包装规格】

96人份/盒

【预期用途】

仅供科研使用，定量检测血清、血浆、组织等相关液体样本中VLCFA的浓度。

实验原理

本试剂盒采用竞争法酶联免疫吸附试验 (ELISA)。在预包被抗极长链脂肪酸 (VLCFA) 抗体 (固相抗体) 的微孔酶标板中，加入极长链脂肪酸 (VLCFA) 校准品和待测样本，再加入HRP标记的极长链脂肪酸 (VLCFA) 抗原 (酶标抗原)，经过温育与充分洗涤，去除未结合的组分，在微孔板固相表面形成固相抗体-酶标抗原的免疫复合物。加底物A和B，底物在HRP催化下，产生蓝色产物，在终止液 (2M 硫酸) 作用下，最终转化为黄色，在酶标仪450nm波长上测定吸光度 (OD值)，吸光度 (OD值) 与待测样品中极长链脂肪酸 (VLCFA) 的浓度负相关。拟合校准品曲线，可以计算出样本中极长链脂肪酸 (VLCFA) 的浓度。

试剂盒限制性

- 1、仅供科研使用，不得用于临床诊断。
- 2、在试剂盒标示的有效期内使用，过期产品不得使用。
- 3、跟其他厂家的试剂盒或者组分不能混用。
- 4、使用试剂盒配套的样品稀释液。
- 5、如果样本值高于最高标准品浓度值，请将样本适当稀释后，再重新测定。
- 6、待测样本中存在的人抗鼠等异嗜抗体会干扰检测结果，检测前，请排出该因素。
- 7、通过其他方法得到的检测结果，与本试剂盒测定结果不具有直接的可比性。



技术提示

- 1、混合蛋白溶液时，避免起泡。
- 2、加校准品与样本时，每个校准品浓度和样本都要更换移液枪头，公共组分应该悬臂加样，避免交叉污染。
- 3、合适的温育时间，和充分的洗涤步骤，是保证实验结果准确性的必要条件。
- 4、使用自动洗板机时，加入一个30秒浸泡的步骤，可以提高检测精度。
- 5、底物溶液为无色液体，保存过程中变为蓝色，代表底物溶液已经失效，不得使用。
- 6、终止液加样顺序与底物溶液加样顺序一致，加入终止液后，蓝色底物产物，会瞬间变为黄色。
- 7、实验中，用剩的板条，应立即放回自封袋中，密封（低温干燥）保存。
- 8、所有液体组分，使用前充分摇匀，严格按照说明书标明的时间、加样量及加样顺序进行温育操作。

试剂盒组分与保存

未开封的试剂盒保存在2-8度，不得使用过期试剂盒。

组分	数量	主要成分	开封后储存
校准品	0.35ml/管	--	2-8°C14天
包被微孔板	96T/48T	预包被固相抗体	2-8°C14天
HRP标记抗原	10mL	HRP标记的检测抗原	2-8°C180天
底物液A	6mL	0.01%过氧化氢	2-8°C180天
底物液B	6mL	0.1%TMB	2-8°C180天
终止液	6mL	2mol/L稀硫酸	2-8°C180天
20×浓缩洗涤液	25mL	0.05%Tween20	2-8°C180天
说明书	1份	--	--
自封袋	1个	--	--
不干胶	2片	--	--



标准品（冻干品）：试剂盒提供了已知浓度的6支标准品：



编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6
pg/mL	500	250	125	62.5	31.25	0

其他用品

- 1、酶标仪（450nm）
- 2、精密移液器及一次性吸头
- 3、蒸馏水
- 4、洗瓶或者自动洗板机
- 5、37°C水浴锅或恒温箱
- 6、500ml量筒

生物安全

- 1、检测必须符合实验室管理规范的规定，严格防止交叉污染，所有样品、洗弃液和各种废弃物都应按照传染病进行处置。
- 2、试剂盒的液体组分中，含有proclin-300防腐剂，可能引起皮肤过敏反应，避免吸入烟雾与皮肤接触。
- 3、底物液对皮肤、眼睛和上呼吸道有刺激作用，避免吸入烟雾。
- 4、戴上防护手套，实验完成后彻底洗手。



样品的采集和储存

以下只是列出样品采集和保存的一般指南。所有样本采集保存过程中，不得使用叠氮钠做为防腐剂。

- 1、**细胞培养上清**：4000rpm条件下离心20min，去除细胞颗粒和聚合物，上清液保存在-20℃以下，避免反复冻融。
- 2、**血清**：使用不含热原和内毒素的试管，操作过程中避免任何细胞刺激，4000rpm条件下离心20min，小心地分离出血清，保存在-20℃以下，避免反复冻融。
- 3、**血浆**：肝素，EDTA，或柠檬酸钠作为抗凝剂。在4000rpm条件下，离心20分钟取上清，血浆保存在-20℃以下，避免反复冻融。

样本收集后，无法一次检测完毕，请按一次用量分装冻存，避免反复冻融，使用时在室温下解冻，确保样品均匀充分解冻。

- 4、**组织匀浆**：用预冷的PBS (0.01 M, pH=7.4) 冲洗组织，去除残留血液，称重后将组织剪碎。将剪碎的组织与对应体积的PBS (一般按1:9的重量体积比，比如1g的组织样品对应9 mL的PBS，具体体积可根据实验需要适当调整，并做好记录。推荐在PBS中加入蛋白酶抑制剂) 加入玻璃匀浆器中，在冰上充分研磨。为了进一步裂解组织细胞，可以对匀浆液进行超声破碎或反复冻融。最后将匀浆液5000×g离心5-10分钟，取上清检测。
- 5、**细胞提取液**：贴壁细胞用冷的PBS轻轻清洗，然后用胰蛋白酶消化，1000×g离心5分钟后收集细胞；悬浮细胞可直接离心收集。收集的细胞用冷的PBS洗涤3次。每1×10⁶个细胞中加入150-200 μL PBS重悬并通过反复冻融使细胞破碎(若含量很低可减少PBS的体积)。将提取液于1500×g离心10分钟，取上清检测。
- 6、**其他生物体液**：1000×g离心20分钟，除去杂质及细胞碎片。取上清检测。

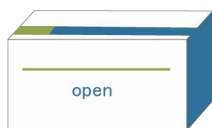
试剂准备

- 1、使用前，所有的组分都要至少复温60min，确保充分复温到室温。
- 2、**浓缩洗涤液**：从冰箱取出的浓缩洗涤液，会有结晶产生，这属于正常现象，水浴加热使结晶完全溶解。浓缩洗涤液与蒸馏水，按1:20稀释，即1份的浓缩洗涤液，添加19份的蒸馏水。
- 3、**底物**：底物液A和B，在使用前，按1:1体积充分混合，混合后15分钟内使用。

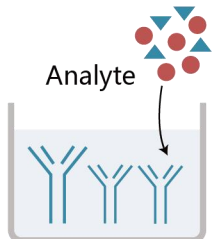


操作程序

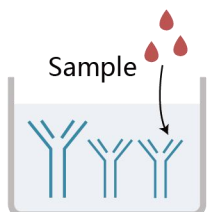
所有试剂和组分都先恢复到室温，标准品、质控品和样品，建议做复孔。



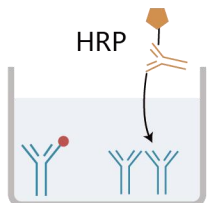
第一步：试剂盒室温平衡 30min，然后从铝箔袋中取出所需板条，剩余板条用自封袋密封放回4℃。



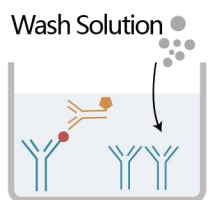
第二步：设置标准品孔和样本孔，标准品孔各加不同浓度的标准品 50 μL。



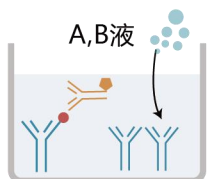
第三步：样本孔中加入待测样本 50 μL；空白孔不加。



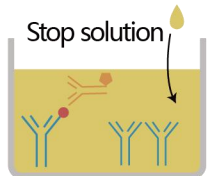
第四步：除空白孔外，标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的检测抗原 100 μL，用封板膜封住反应孔，37℃水浴锅或恒温箱温育 60min。



第五步：弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液（350 μL），静置 1min，甩去洗涤液，吸水纸上拍干，如此重复洗板 5 次（也可用洗板机洗板）。



第六步：每孔加入底物 A、B 各 50 μL，37℃避光孵育 15min。

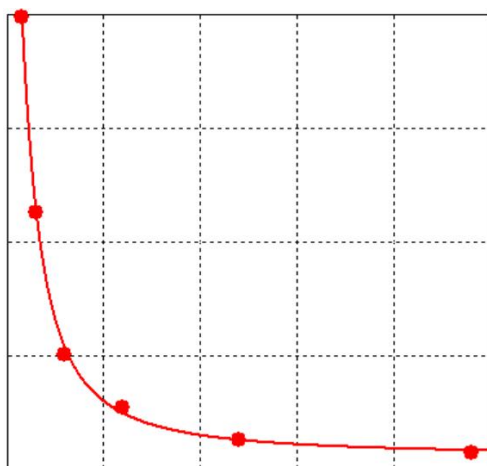


第七步：每孔加入终止液 50 μL，15min 内，在 450nm 波长处测定各孔的 O.D 值。



结果计算

- 1、以标准品浓度做为横坐标，对应的吸光度（OD值）作为纵坐标，利用计算机软件，采用四参数Logistic曲线拟合（4-pl），创建标准曲线方程，通过样品的吸光度（OD值），利用方程计算样品的浓度值。
- 2、如果样品被稀释，通过上述方法测的浓度值，要乘以稀释倍数，才是样品的最终浓度。



（示意图，仅供参考）

试剂盒性能指标

1、物理性能

试剂盒的各液体组分应澄清透明、无沉淀或者絮状物。微孔板铝箔袋应真空包装，无破损漏气。

2、剂量反应曲线线性

校准品剂量反应曲线相关系数 r 值，大于等于0.9900。

3、精密度

批内精密度：三组已知的高、中、低浓度样品，进行二十次在同一个板块内精度评估。

批内变异系数CV%小于10%。

批间精密度：三组已知的高、中、低浓度样品，进行二十次在不同板块内精度评估。批

间变异系数CV%小于15%。

4、灵敏度

最低检出剂量小于0.1 pg/mL。



5、回收率

三组已知的高、中、低浓度样品，进行五次在同一个板块内回收率评估，回收率在85%-115%之间。

6、特异性

本试剂盒识别天然和重组极长链脂肪酸 (VLCFA)，与结构类似物无交叉。

7、稳定性

2°C-8°C保存，有效期6个月。

4、检测范围

15.625 pg/mL - 500 pg/mL

废物处理

所有使用或未使用的试剂，所有污染性的一次性材料，应当遵循传染性或潜在传染性产品的处理程序，每个实验室都有责任根据其实验的类型和危险性级别，进行废物和污物的处理，同时要严格依照有关规定对待所有的废物和污物。

