



INSTRUCTION MANUAL



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

PLEASE READ THROUGH ENTIRE procedure BEFORE BEGINNING!

<http://zcibio.com>

仅供科研使用，不得用于临床检验。

斑马鱼多巴胺（DA）定量检测试剂盒（ELISA）说明书

【产品名称】

通用名称：斑马鱼多巴胺（DA）定量检测试剂盒（ELISA）

英文名称：zebra fish dopamine（DA）ELISA KIT

货 号：ZC-54805-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、组织中多巴胺（DA）的浓度。

【检验原理】

试剂盒采用酶联免疫分析方法。采用生物素标记多巴胺（DA），纯化的抗多巴胺（DA）抗体包被微孔板，在竞争抑制反应中，一定量的固相抗体与生物素标记多巴胺（DA）及非标记抗原（校准品或标本）进行抑制竞争反应，抗体与生物素标记的多巴胺（DA）结合量受非标记抗原量所抑制，非标记抗原量多，抗体与生物素标记的多巴胺（DA）结合就少，反之结合就多；反应平衡后，形成固相抗体-生物素化多巴胺（DA），再加入酶标记的亲合素，形成固相抗体-生物素化多巴胺（DA）-酶标-亲合素复合物。经加底物显色后，用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度（OD 值）。随着多巴胺（DA）浓度的升高，OD 值逐渐下降呈良好的线性关系。本试剂盒具有灵敏度高、特异性强、重复性好、操作简单、快速等特点，对血清中多巴胺（DA）的减少或升高有可靠的检出性能。

【主要组成成分】

主要成分

组分	数量	主要成分
校准品	0.5ml/管*6 管	抗原配制的 6 个浓度标准品
包被微孔板	96T	预包被固相抗体
HRP 标记抗体	6mL	HRP 标记的检测抗体
生物素化抗原	6mL	检测抗原
底物液 A	6mL	过氧化脲工作液
底物液 B	6mL	TMB 工作液
终止液	6mL	2mol/L 稀释液
20×浓缩洗涤液	30mL	含 0.15%Tween20 的 PBS
说明书	1 份	--
自封袋	1 个	--
不干胶	2 片	--

校准品浓度依次为：1600、800、400、200、100、0 pg/mL。校准品已经通过测试，结果表明 HBs 抗原阴性，HIV1、HIV2 和 HCV 抗体阴性，由于不存在一种试验方法能够完全保证没有这些物质，本品必须按照具有潜在的感染性进行处理，处理过程应当遵循通用的安全措施。

需要但未提供的材料及耗材

- 1、酶标仪
- 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℃水浴锅或恒温箱
- 6、500ml 量筒
- 7、无粉一次性乳胶手套

【储存条件及有效期】

- 1、2-8℃保存，切勿冷冻，有效期 6 个月。
- 2、开封使用后，包被微孔板放入带有干燥剂的自封袋中，密闭自封袋，并将全部试剂放回

2-8℃冰箱。

3、开封后，按照建议的条件保存，校准品、包被微孔板和 HRP 标记抗体，有效期为 14 天，其他成分在标签标明的有效期内是稳定的。

【适用仪器】

半自动的酶标仪，如 Thermo MK3，或者国产酶标仪。

【样本要求】

样本类型和采集

以下只是列出样品采集的一般指南。所有样本采集过程中，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。

4、唾液：用无菌管收集，2-8℃条件离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分），仔细收集上清，保存过程中如有沉淀形成，应再次离心

样本保存和稳定性

样本在 2-8℃条件下，可以储存 72h，或者在-20℃储存 6 个月。样本收集后，不是一次检测完，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。

【检验方法】

试剂准备

1、使用前，所有的组分都要至少复温 30min，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。

操作程序

1. 将各种试剂移至室温平衡半小时，取浓缩洗涤液，根据当批检测数量，用蒸馏水 1: 20 稀释，混匀后备用。
2. 将预包被板从密封袋中取出，设一个空白对照孔，不加任何液体；每个校准品设 2 孔，每孔加入对应校准品 50 μ l；其余每个检测孔直接加待测血清或质控品 50 μ l。
3. 除空白孔外所有孔加入生物素化抗原 50 μ l，混匀，贴上封板膜，置 37 $^{\circ}$ C 温育 60 分钟。
4. 手工洗板：弃去孔内液体，洗涤液注满各孔，静置 10 秒甩干，重复 3 次后拍干。洗板机洗板：选择洗涤 3 次程序洗板后拍干。
5. 每孔加入酶标亲合素 50 μ l（空白对照孔除外），混匀，贴上封板膜，置 37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟。
6. 手工洗板：弃去孔内液体，洗涤液注满各孔，静置 10 秒甩干，重复 3 次后拍干。洗板机洗板：选择洗涤 3 次程序洗板后拍干。
7. 每孔加显色剂 A 50 μ l，显色剂 B 50 μ l，振荡混匀后，置 37 $^{\circ}$ C 避光显色 15 分钟，每孔加终止液 50 μ l。
8. 用酶标仪读数，取波长 450nm，先用空白对照孔调零点，然后测定各孔光密度值（OD 值）。

【检验结果的解释】

1. 各校准品、质控及样品的吸光值（OD 值）均需扣除空白孔的 OD 值。
2. 作图法：以校准品 S1~S5 的吸光值为纵轴（log 对数坐标），相应浓度为横轴（log 对数坐标），在对数坐标纸上绘制校准品曲线，在校准品曲线上查出待测标本的 DA 含量（pg/ml）。
3. 计算机：由电脑计算出其浓度。

【检验方法的局限性】

- 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，请排除该因素。
- 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。

【产品性能指标】

1. 外观和物理检查:试剂盒应组分齐全,内外包装均应完整,标签清晰,液体试剂无渗漏。各组分装量不少于表 1 中要求。
2. 准确性:试剂盒内校准品与相应浓度的国家标准品同时进行分析测定,用双对数(log-log)拟合,要求两条剂量-反应曲线不显著偏离平行(t 检验);以 DA 国家标准品为对照品,试剂盒内校准品的实测效价与标示值效价的比应在 0.900~1.100 之间。
3. 线性:用 log-log 数学模型拟合,在 100~1600pg/mL 范围内,剂量-反应曲线相关系数(r)的绝对值应不低于 0.9900。
4. 精密度
 - 4.1 分析内精密度:试剂盒质控品测定结果的变异系数(CV)应不大于 15.0%。
 - 4.2 批间精密度:在三个不同批次产品之间,质控品测定结果的变异系数(CV)应不大于 15.0%
5. 最低检出限:应不高于 1ng/ml。
6. 质控品测定值:每次检测结果均应在允许范围内。

【注意事项】

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物进行处置。
- 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。戴上防护手套,实验完成后彻底洗手。

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、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。
- 5、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。

6、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。

7、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。

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。

附言

ELISA 法手工测定的影响因素

ELISA 法具有灵敏度高、特异性强、重复性好的特点，并具有操作简便、无放射性危害的优点，因而多年来广泛应用于血站和医院的实验室中，但在测定中常会出现一些误差和问题。我们通过几年的实验观察，认为影响结果的因素有如下方面。

1. 试验仪器

(1) 加样器是否经过校正，酶免测定血清用量很少，如手工加样器的性能不好，吸取样品不精确，会使结果忽高忽低。

(2) 每次洗板前，应检查洗板机针孔有无堵塞。

2 . 操作

(1) 检测前先将试剂盒从冰箱取出置室温平衡 20min 后使用，试剂用完及时放回冰箱冷藏，以免造成试验结果假性降低。

(2) 加样时注意勿触及包被板底部，以免擦伤包被物使抗体（抗原）脱落而影响实验结果的准确性。

(3) 洗涤不充分，会使结果假性增高，过分洗涤呈假阴性。

(4) 比色时应保持包被孔底部无异物、无水汽，特别是冬季板从 37℃ 水浴箱取出时，底部留有水汽，应将板底擦干后进行比色，水汽或孔内气泡也会使 OD 值升高。

(5) 抗原与抗体反应达到完全平衡，依赖于温度与时间。温度高于 45℃ 易引起失活及标记物脱落，温度低于 4℃，影响反应速度。总之，由于 ELISA 实验的影响因素较多，在实际工作中必须操作规范、仔细，避免和排除各种因素的影响，使之得到准确可靠的检验结果。

www.zcibio.com

Shanghai ZCIBIO Technology Co.,Ltd.

TEL:021-65681082

Email:zcibio@163.com