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。

斑马鱼去甲肾上腺素（NE）定量检测试剂盒（ELISA）说明书

【产品名称】

通用名称：斑马鱼去甲肾上腺素（NE）定量检测试剂盒（ELISA）

英文名称：Zerba FISH NE ELISA KIT

货　号:　ZC-55092-J

【包装规格】

96T/48T

【预期用途】

仅供科研使用，定量检测血清、血浆、细胞培养上清液中斑马鱼去甲肾上腺素（NE）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）。在预包被抗斑马鱼去甲肾上腺素（NE）抗体（固相抗体）的微孔酶标板中，加入斑马鱼去甲肾上腺素（NE）校准品和待测样本，再加入HRP标记的斑马鱼去甲肾上腺素（NE）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）与待测样品中斑马鱼去甲肾上腺素（NE）的浓度负相关。拟合校准品曲线，可以计算出样本中斑马鱼去甲肾上腺素（NE）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℃14天
包被微孔板	96T/48T	预包被固相抗体	2-8℃14天
HRP标记抗原	10mL	HRP标记的检测抗原	2-8℃180天
底物液A	6mL	0.01%过氧化氢	2-8℃180天
底物液B	6mL	0.1%TMB	2-8℃180天
终止液	6mL	2mol/L稀硫酸	2-8℃180天
20×浓缩洗涤液	25mL	0.05%Tween20	2-8℃180天
说明书	1份	--	--
自封袋	1个	--	--
不干胶	2片	--	--

标准品浓度依次为：120、60、30、15、7.5、0 ng/mL.

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℃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。

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 150-200μLPBS 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。

1、按前面说明书描述的方法，配制好试剂盒各种组分的工作液。

2、从铝箔袋中取出所需板条，剩余的板条用自封袋密封放回冰箱。

设置标准品孔、空白孔和样本孔，标准品孔各加不同浓度的标准品50μL，空白孔不加，样本孔加待测样本50μL。

3、除空白孔外，标准品孔和样本孔，加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的检测抗原100μL。

4、用封板膜盖住反应板，37℃水浴锅或恒温箱温育 60min。

5、揭开封板膜，弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液，静置 20S，甩去洗涤液，吸水纸上拍干，如此重复 5 次。若使用自动洗板机，请按洗板机操作程序进行洗板，添加浸泡 30s 的程序，可以提高检测的精度。洗板结束，加底物前，要在干净不掉屑的纸上，充分拍干反应板。

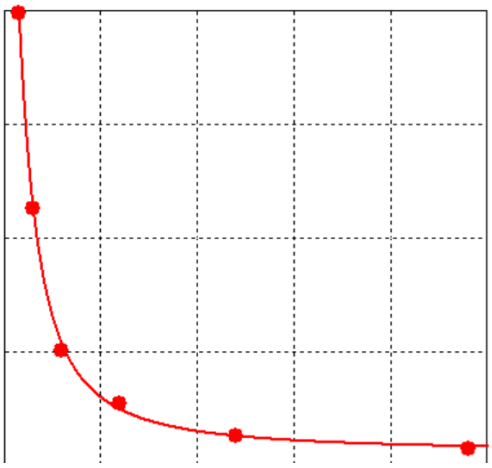
6、将底物 A 和 B 按 1:1 体积充分混合，所有孔中加入底物混合液 100μL。用封板膜盖住反应板，37℃水浴锅或恒温箱温育 15min。

7、所有孔加入终止液 50μL，在酶标仪上读取各孔吸光度（OD 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，通过样本的吸光度（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 ng/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斑马鱼去甲肾上腺素（NE），与结构类似物无交叉。

7、稳定性

2℃-8℃保存，有效期 6 个月。

8、 检测范围

3.75 ng/mL - 120 ng/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。

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，酶免测定血清用血量很少，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