人磷酸化神经丝 H(pNF-H)酶联免疫吸附检测试剂盒

货号：WGD-K-17136

检测类型： 夹心法

可检测样本类型： 血清、血浆、组织匀浆和其他生物体液

灵敏度： 5.7 pg/mL

检测范围： 15.63-1000 pg/mL

特异性： 可检测样本中的人 pNF-H，且不与其它相关蛋白交叉反应

试剂盒组成

中文名称	英文名称	规格		保存条件
		48T	96T	
酶标板（可拆）	Pre-coated Microplate	6 条 x 8 孔	12 条 x 8 孔	4°C/-20°C
冻干标准品	Standard (lyophilized)	1	2	4°C/-20°C
标准品&样品稀释液	Standard/Sample Diluent Buffer	10 mL	20 mL	4°C/-20°C
浓缩生物素化抗体（100×）	Biotinylated Antibody (100×)	60 µL	120 µL	4°C/-20°C
生物素化抗体稀释液	Biotinylated Antibody Diluent	6 mL	12 mL	4°C/-20°C
浓缩 HRP 酶结合物（100×）	Streptavidin-HRP (100×)	60 µL	120 µL	4°C/-20°C
酶结合物稀释液	HRP Diluent	6 mL	12 mL	4°C/-20°C
浓缩洗涤液（25×）	Wash Buffer (25×)	10 mL	20 mL	4°C/-20°C
显色底物溶液（TMB）	TMB Substrate Solution	6 mL	10 mL	4°C/-20°C(避光）
反应终止液	Stop Reagent	3 mL	6 mL	4°C/-20°C
封板覆膜	Plate Covers	1	2	常温
产品说明书	Instruction Manual	1 份	1 份	常温

特别说明

1. 打开包装后请及时检查所有物品是否齐全完整。所有试剂的批号见标签。
2. *试剂盒拆封后可 4°C 保存 1 周，如果 1 周内未用完，请将剩余酶标板，冻干标准品，浓缩生物素化抗体，浓缩 HRP 酶结合物放置在-20°C 保存，其他试剂 4°C 保存，并在 6 个月内用完。
   *若试剂盒未拆封：4°C（短时间存放，6 个月内有效）；-20°C（长时间存放，1 年内有效）；避免反复冻融，过期后请勿使用。
3. 如果试剂盒整盒保存在-20°C，请在实验前一天晚上将试剂盒放置在 4°C。
4. 浓缩洗涤液低温保存会有盐析出，稀释时可在水浴中加温助溶。
5. 刚开启的酶标板孔中可能会含有少许水样物质，此为正常现象，不会对实验结果造成任何影响。
6. 所有试剂盒组件都经过了配方和质量控制测试，以成功地作为一个试剂盒发挥作用。不要混合或替代其他试剂盒的试剂或材料，如果单独使用或替换，性能无法保证。

实验所需自备物品

1. 标准规格酶标仪（含波长 450 nm）
2. 高速离心机
3. 电热恒温箱
4. 混匀器
5. 高精度移液器，EP 管及一次性吸头（0.5-10 μL、2-20 μL、20-200 μL、200-1000 μL）
6. 双蒸水或去离子水，容量瓶，吸水纸等。

安全事项

1. 本试剂盒仅供实验室研究和开发使用，不用于人类或动物。
2. 试剂应按危险物质处理，应小心处理并妥善处置。
3. 应始终佩戴手套、实验服和防护眼镜，避免皮肤和眼睛接触终止液和 TMB。如不慎接触，请用水彻底清洗。

检测原理

本试剂盒采用夹心法原理。将特异性抗人 pNF-H 抗体包被于 96 孔微孔板中，向微孔中分别加入人 pNF-H 标准品或样本，使标准品中的人 pNF-H 蛋白或样本中的人 pNF-H 蛋白与固相于微孔板上的抗人 pNF-H 抗体结合，然后加入生物素化抗人 pNF-H 抗体，将未结合的生物素化抗体洗净后，加入 HRP 标记链亲和素，再次彻底洗涤后加入 TMB 底物显色。TMB 在过氧化物酶催化下转化成蓝色，并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的人 pNF-H 蛋白呈正相关。用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度(OD 值)，通过绘制标准曲线计算出样品浓度。

样本收集准备及保存

1. 血清：全血样品于室温放置 2 小时或 4°C 过夜后于 1000×g 离心 20 分钟，取上清即可检测。收集血液的试管应为一次性的无热源，无内毒素试管。存放-20°C 或-80°C 保存，应避免反复冻融。
2. 血浆：样品在采集后的 30 分钟内于 2-8°C、1000×g 离心 15 分钟，取上清即可检测。抗凝剂推荐使用 EDTA-Na_2，避免使用溶血，高血脂样品。存放-20℃ 或-80℃ 保存，应避免反复冻融。
3. 组织匀浆：取适量组织块，于预冷的 PBS（0.01M，pH7.0-7.2）中清洗去除血液（匀浆中裂解的红细胞会影响测量结果），称重后将组织剪碎，然后与对应体积的 PBS（一般按照 1:9 的质量体积比，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 1%蛋白酶抑制剂）加入玻璃匀浆器中，于冰上充分研磨；为了进一步裂解组织细胞，可对匀浆液进行超声破碎或反复冻融处理（超声破碎过程中注意冰浴降温，反复冻融法可重复 2 次）。最后将制备好的匀浆液于 5000×g 离心 5-10 分钟，取上清即可检测。（组织匀浆需要同时检测蛋白质浓度，以获得每毫克蛋白质中更准确的测试物质浓度。）
4. 细胞培养上清：取细胞上清于1000×g离心20分钟，除去杂质及细胞碎片。取上清即可检测，置于-20°C或-80°C保存，但应避免反复冻融。
5. 尿液：请收集清晨第一次尿液（中段尿），或 24小时尿液，2000×g 离心 15 分钟后收集上清，并将样本保存 于-20°C，且应避免反复冻融。
6. 唾液：用唾液样本采集管收集样本，然后于 2-8°C, 1000×g 离心 15 分钟，取上清即可检测，或分装后于-20°C 保存。避免反复冻融。
7. 其它生物样品：请 1000×g 离心 20 分钟，取上清即可检测。

注意事项

1. 样品应清澈透明，悬浮物应离心去除，样品溶血会影响结果，故不宜使用溶血样本。
2. 样品收集后若在 1 周内进行检测可保存于 4°C，若不能及时检测，请按一次使用量分装，冻存于-20°C（1 个月内检测），或-80°C（3-6 月内检测），避免反复冻融。实验之前请将样本置于室温。

样品稀释原则

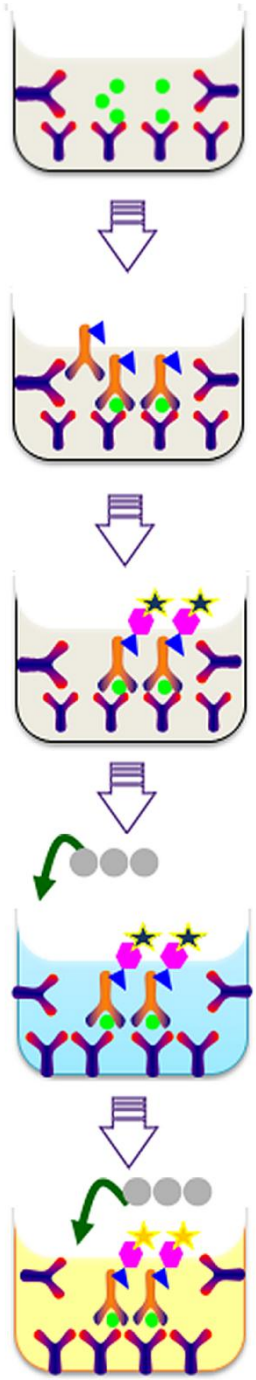
如果您的检测样本需要稀释，通用稀释原则参考如下：

1. 稀释 50 倍：一步稀释。取 5 μL 样本到 245 μL 标准品&样本稀释液内，为 50 倍稀释；
2. 稀释 100 倍：一步稀释。取 5 μL 样本到 495 μL 标准品&样本稀释液内，为 100 倍稀释；
3. 稀释 1000 倍：两步稀释。取 5 μL 样本到 95 μL 标准品&样本稀释液内，为 20 倍稀释，再取 5 μL 20 倍稀释样本到 245 μL 标准品&样本稀释液内，为 50 倍稀释，共稀释 1000 倍；
4. 稀释 100000 倍：三步稀释。取 5 μL 样本到 195 μL 标准品&样本稀释液内，为 40 倍稀释，再取 5 μL 40 倍稀释样本到 245 μL 标准品&样本稀释液内，做 50 倍稀释，最后取 5 μL 2000 倍稀释样本到 245 μL 标准品&样本稀释液内，做 50 倍稀释，总共稀释 100000 倍；
5. 每步稀释时取液量不少于 3 μL，稀释倍数不超过 100 倍。过小的取样量在混匀过程中容易引起更大的误差，每步稀释都需混合均匀，避免起泡。
6. 稀释倍数很高的情况下，可以先用 PBS 稀释，最后一步使用试剂盒中的标准品&样本稀释液。

样本稀释建议

1. 正常新鲜的血清/血浆样本推荐(Original solution-1:2)测试。
2. 由于存在个体差异，建议的稀释倍数仅供参考。实际检测请提前预估样本的浓度范围，并通过预实验确定待检测样本的稀释倍数。

操作概要



1. 试剂盒和样本室温平衡后，每孔加入标准工作缓冲液 100 µL(按说明书梯度稀释)或样品 100 µL，37°C 孵育 80 分钟。

2. 弃去酶标板中液体，每孔加入 200 µL 洗涤缓冲液，洗涤 3 次。拍干后，每孔加入 100 µL 生物素化抗体工作液，37°C 孵育 50 分钟。

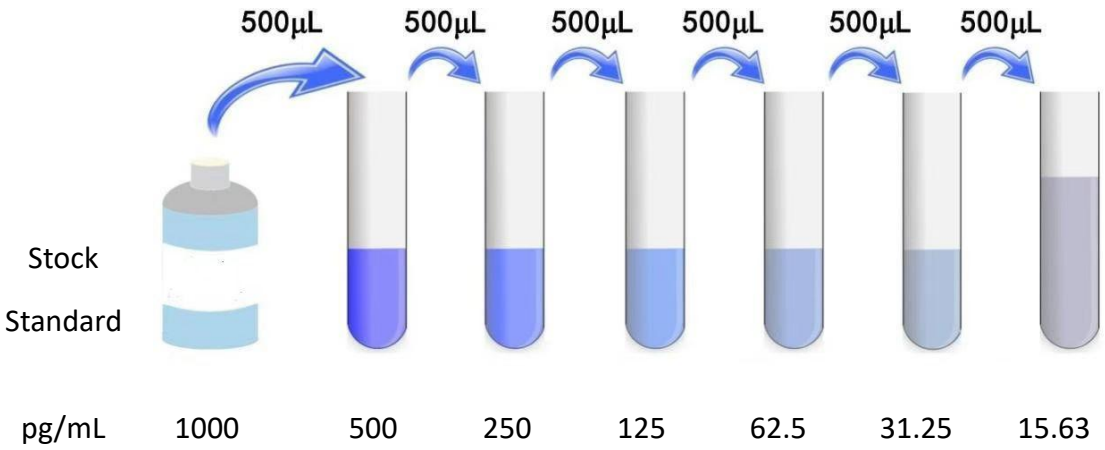
3. 弃去酶标板中液体，每孔加入 200 µL 洗涤缓冲液，洗涤 3 次。 拍干后，每孔加入 100 µL HRP 酶工作液，37°C 孵育 50 分钟。

4. 弃去酶标板内液体，每孔加入 200 µL 洗涤缓冲液，洗涤 5 次。拍干后，每孔加入 90 µL TMB，37°C 孵育 20 min。

5. 每孔加入 50 µL 终止液，450 nm 立即读数，计算结果。

检测前准备工作

1. 请提前 30 分钟从冰箱中取出试剂盒，平衡至室温。
2. 用双蒸水将 25×浓缩洗涤液稀释成 1×工作液，未用完的放回 4°C。
3. 标准品：加入标准品&样品通用稀释液 1.0 mL 至冻干标准品中，旋紧管盖，静置 10 分钟，待其充分溶解后，轻轻混匀（浓度为 1000 pg/mL）。此后进行倍比稀释成 1000 pg/mL，500 pg/mL，250 pg/mL，125 pg/mL，62.5 pg/mL，31.25 pg/mL，15.63 pg/mL 标准品稀释液（0 pg/mL）为空白孔。根据您需要的量配置好标准品待用。配置好的标准品建议在 15 分钟内加样，不建议放置过长时间。



4. 生物素化抗体工作液：实验前计算当次实验所需用量（按100 µL/孔计，实际配置时应多配置100-200 µL），使用前15分钟，用生物素化抗体稀释液稀释浓缩生物素化抗体（1:100）成工作浓度，当日使用。稀释原则即取1 µL浓缩生物素化抗体加到99 µL生物素化抗体稀释液中，用移液器混匀。
5. 酶结合物工作液：实验前计算当次实验所需用量（按 100 µL/孔计，实际配置时应多配置 100-200 µL）。使用前 15 分钟，用酶结合物稀释液稀释浓缩 HRP 酶结合物（1:100）成工作浓度，当日使用。稀释原则即取 1 µL 浓缩酶结合物加到 99 µL 酶结合物稀释液中，用移液器混匀。
6. TMB 底物——用移液器吸取所需剂量的溶液，不要将残留溶液再次倒回试剂瓶。

注意事项

1. 试剂盒使用前请确定所有组分是溶解并混匀的状态。复溶后的标准品若未用完，请废弃。
2. 浓缩生物素化抗体，浓缩酶结合物体积较小，运输过程中可能会分散在管子各部位，使用前请 1000×g 离心 1 分钟，以使管壁或瓶盖的液体沉积到管底。取用前用移液器小心吹打 4-5 次使溶液混匀。标准品、生物素化抗体工作液、酶结合物工作液请根据所需用量配置，并使用相应的稀释液配置，不能混淆。
3. 从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶，此为正常现象，可水浴或者培养箱中使结晶完全溶解后再配置洗涤液（加热温度不要超过 40°C）。使用时洗涤液应为室温。
4. 加样需迅速，每次加样最好控制在 10 分钟以内，为了保证实验准确性，建议使用复孔。当移液试剂时，从一个孔到另一个孔保持一致的添加顺序， 这将确保所有孔的孵化时间相同。
5. 洗涤过程中反应孔中残留的洗涤液应在吸水纸上拍干，勿将滤纸直接放入反应孔中吸水。在读数前要注意清除底部残留的液体和手指印，以免影响酶标仪读数。
6. 显色剂 TMB 在储存和使用过程中应避免强光直接照射。此外，避免 TMB 底物溶液与金属接触，以防颜色反应。
7. 实验过程中使用的试管及试剂均为一次性，严禁重复使用，否则将影响实验结果。
8. 实验过程中请穿着实验服并带乳胶手套做好防护工作，特别是检测血液或者其它体液样品时，请按国家生物实验室安全防护条例执行。
9. 不同批号的试剂盒组分不能混用（洗涤液和反应终止液除外）。
10. 试剂盒内酶标条为可拆板，请根据实验需求分批使用。

实验前准备

1. 使用前将所有材料和制备的试剂平衡至室温。 使用前，充分混合所有试剂，注意不要产生任何泡沫。
2. 用户应计算整个试验中可能使用的样品数量。 请提前预留足够的样品。
3. 测定前请预估浓度。 如果这些值不在标准曲线范围内，用户必须确定其特定实验的最佳样品稀释度。

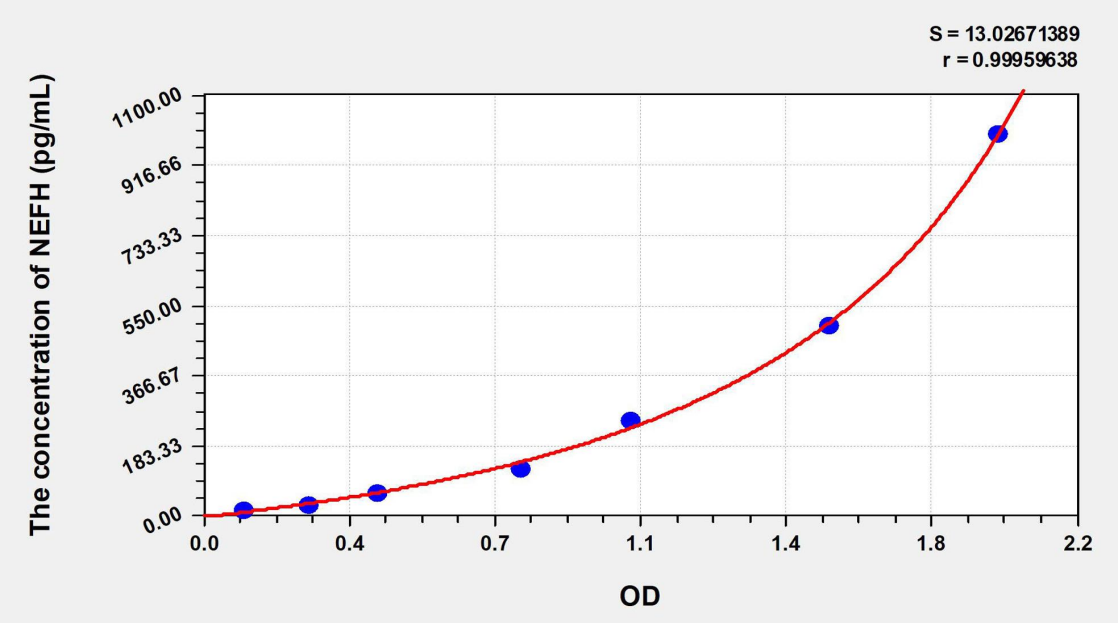
操作步骤

1. 实验开始前，各试剂均应平衡至室温，提前配置好所有试剂。试剂或样品稀释时，均需混匀，混匀时尽量避免起泡。如果样品浓度过高，用样品稀释液进行稀释，以使样品符合试剂盒的检测范围。
2. 加标准品或者待测样品 100 µL（样品需要稀释的，稀释方法请参照样品稀释原则），注意不要有气泡，加样时将样品加于酶标板孔底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀，酶标板加上盖或覆膜，37°C 孵育 80 分钟。为保证实验结果有效性，每次实验请使用新的标准品溶液。
3. 弃去孔内液体，甩干，洗板 3 次。每孔用 200 µL 的洗涤液洗涤，浸泡 1-2 分钟，甩掉酶标板内的液体（或用洗板机进行洗板）。最后一次洗涤完成后，在吸水纸上将酶标板拍干。
4. 每孔加生物素抗体工作液 100µL（可提前 15 分钟配制），酶标板加上覆膜，37°C 孵育 50 分钟。
5. 弃去孔内液体，洗板 3 次。每孔用 200µL 的洗涤液洗涤，浸泡 1-2 分钟，甩掉酶标板内的液体（或用洗板机进行洗板）。最后一次洗涤完成后，在吸水纸上将酶标板拍干。
6. 每孔加酶结合物工作液 100 µL（可提前 15 分钟配制），37°C 孵育 50 分钟。
7. 弃去孔内液体，洗板 5 次。每孔用 200 µL 的洗涤液洗涤，浸泡 1-2 分钟，甩掉酶标板内的液体（或用洗板机进行洗板）。最后一次洗涤完成后，在吸水纸上将酶标板拍干。
8. 每孔加入 TMB 显色底物溶液 90 µL，37°C 避光孵育 20 分钟（根据实际显色情况酌情缩短或延长，但不可超过 30 分钟）。
9. 每孔加入终止液 50 µL，终止反应（此时蓝色立转黄色）。终止液的加入顺序应尽量与显色剂的加入顺序相同。为了保证实验结果的准确性，底物反应时间到后应尽快加入终止液。
10. 立即用酶标仪在 450 nm 波长的情况下测量各孔的光密度值（OD 值）。仪器使用前应预热，并设置好检测程序。

结果计算

1. 每个标准品和样品的 OD 值应减去空白孔的 OD 值。如设置复孔，则应取平均值计算。
2. 为了便于计算，尽管浓度为自变量而 OD 值为因变量，我们绘图时仍采用标准品的 OD 值作为横坐标（X 轴），标准品的浓度为纵坐标（Y 轴）。同时为了试验结果的直观性，图中提供的是原始数据而非对数值。由于实验操作条件的不同（如操作者、移液技术、洗板技术和温度条件等），标准曲线的 OD 值会有所差异。所提供的标准曲线仅供参考，实验者需要根据自己的实验建立标准曲线。用过样品的 OD 值可在标准曲线上计算出样品浓度，再乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。推荐使用专业的曲线绘制软件，如 curve expert。

Concentration (pg/mL)	OD	Corrected OD
1000	2.058	1.973
500	1.636	1.551
250	1.146	1.061
125	0.872	0.787
62.5	0.518	0.433
31.25	0.347	0.262
15.63	0.185	0.1
0	0.085	0.000



注:此图仅供参考

● 精密度

板内精密度(测定内的精密度):CV%<8%

三个已知浓度的样品分别在 1 个酶标板上测试 20 次，以评估分析板内精密度。

板间精密度(测定板间间精密度):CV%<10%

三个已知浓度的样品分别在 3 个不同的酶标板上测试 40 次，以评估分析板件的精密度。

● 回收率

分别往不同样本中添加已知浓度的人 pNF-H，做回收率实验，得出回收率范围和平均回收率

样本类型	回收率范围	平均回收率
血清(n=5)	85-97%	91%
EDTA 血浆(n=5)	92-105%	98%
heparin 血浆(n=5)	82-95%	88%

● 线性

将添加有人 pNF-H 的样本分别稀释 2 倍，4 倍，8 倍，16 倍做回收实验，得出回收率范围

样本类型	1:2	1:4	1:8	1:16
血清(n=5)	86-100%	93-108%	80-101%	87-96%
EDTA 血浆(n=5)	96-105%	95-103%	95-103%	87-98%
heparin 血浆(n=5)	85-92%	79-96%	89-100%	85-96%

ELISA 实验室常见问题及原因分析

高背景/非特异性染色

结果描述	可能的原因	建议及预防措施
终止后,整板结果显现均一的黄色或淡色;或标曲有线性但背景过高	整版发黄现象可能由于错加其他试剂造成	实验前检查试剂的组分及批号,确认所有组分均属于对应的试剂盒.不同试剂盒或不同批号
	未充分清洗酶标板	确保清洗过程中每个微孔所加入洗涤液量一致.清洗完成后,将酶标板用力按压在吸水纸上,以除去残余的缓冲液.
	孵育时间过长	请严格按照说明书步骤操作
	酶标记物污染了吸头及盛放显色剂容器或阳性对照污染了微孔	吸取不同的试剂时应更换吸头,配置不同的试剂组分时,应使用不同的储存器皿,操作时请使用移液器
	检测抗体或 Avidin-HRP 的浓度过高	检查浓度计算是否正确或进一步稀释后再使用
	底物在使用前曝光或污染	加入底物前,应始终避光保存
	显色时间过长	请严格按照说明书步骤操作
	读取了吸光值时使用了错误的滤光片	TMB 为底物时应在 450nm 波长读取吸光值,并以 650nm 作为校正波长

白板

结果描述	可能的原因	建议及预防措施
显色步骤结束后,酶标板所有孔均无颜色;阳性对照不明显	组分试剂混淆使用	配制或使用时应看清楚标签
	洗版及加样过程中,酶标物受污染失活失去催化显色剂显色的能力	确认盛酶标的容器不含酶抑制剂(如 NaN_3 等),确认配制洗液的容器已洗干净.
	遗漏了某种试剂或某个步骤	详细审阅说明书,并严格遵循操作步骤

显色淡

结果描述	可能的原因	建议及预防措施
包括标曲、样本在内的所有板孔颜色均较淡	试剂盒超过有效期或储存不当	请在有效期内使用,并按照说明书推荐的保存条件保存,避免污染
	试剂、样品用前未平衡	所有试剂、样品应置室温平衡 30min 左右
	移液器吸量不足,移液抽吸排放太快,吸头内壁挂液太多或内壁不清洁	校正移液器,吸头要配套,每次吸头要吻合紧密,移液不宜过快,排放应完全.吸头内壁要清洁,最好一次性使用.
	孵育反应时间不足	定时器准确定时
	显色反应不足	一般在 15-30min
	洗涤次数增加,浓缩洗液稀释倍数不符合要求	减少洗涤冲击力,按照说明书要求稀释浓缩洗液、洗涤时间,准确记录洗涤次数及用量
	蒸馏水水质有问题	配置好的洗液一定要检测 PH 值是否呈中性
	洗板及加样过程中,酶标物受污染失活而失去催化显色剂显色的能力	确认盛酶标的容器不含酶抑制剂(如 NaN_3 等),确认配制洗液的容器已经洗干净,确认配置洗液的纯化水达到要求且未受污染.
标曲正常,样本显色较淡	样本使用 NaN_3 防腐剂,抑制了酶的反应	样本不可使用 NaN_3
	待测样本中可能不含强阳性样本,故结果可能是正常的	如有怀疑,可以复检
目测结果正常,但酶标仪读值偏低	读取吸光值时使用了错误的滤光片	TMB 为底物时应在 450nm 波长读取吸光值,并以 650nm 作为校正波长

标准曲线不佳/重复性不好

结果描述	可能的原因	建议及预防措施
重复性差	标准品配制有误	严格按照说明书标准品配制进行操作，仅使用推荐的稀释液对标准品进行稀释
	试剂盒储存方法不当或储存环境太差	请在说明书推荐的条件下保存，不要将重悬后的组分在室温放置时间过长
	过早稀释各工作组分	各工作组分请在使用前 10 分钟配置，并立即加入到微孔中
	样本加入后未混匀	针对同时加入多种试剂组分，加样后在混匀器上充分混匀，注意稳拿稳放，防止外溅
	酶标仪测定重复性差	校准酶标仪
	孵育时间、洗涤条件、显色条件、操作人员不一致	重复测定样本，反应条件、人员等尽可能与上次保持一致
	洗涤不正确	移液器准确加入 200 μL/孔洗涤液或注满各孔，但不要溢出. 洗板机洗板时不应有堵孔，洗涤应充分
	孵育温度恒温效果不好	保持温度恒定，避免局部温度过高过低
	加液时，过多残留于孔壁上	加液时，吸头在不碰到孔底的前提下尽量沿着孔壁下方加液
	耗材重复使用	吸取不同的试剂时应更换吸头，配置不同的试剂组分时，应使用不同的储液器皿
	微孔底部被划伤或者存在污垢	操作时细心，注意不要触碰底部擦拭酶标板底部，以去除污垢或者指纹
	阈值附近时阴时阳	同一样品做 3 个复孔，以 2 个(含 2 个以上相同结果为准)
	加样时交叉污染	加样本时尽量避免交叉污染

结果描述	可能的原因	建议及预防措施
出现随机性的花板、跳孔现象	手工洗板造成的交叉污染	手工洗板时前 3 次注洗液后应立即弃去,后几次再设定浸泡时间,可以减少交叉污染
	拍板时交叉污染	拍板时用合适的吸水纸巾,不要把无关物质拍进板孔,并尽量不要在同一位置拍,以免交叉污染
	洗板机加液头堵塞导致加液不满或吸液残留量较大,造成花板、跳孔	疏通加液头,使洗板时每孔均注满洗液,吸液时残留量要小
	样本离心处理不全,致使反应孔内发生凝血现象或存在沉淀物或残留细胞成分干扰	血清血浆应充分离心,3000 rpm 6min 以上
	样品放置时间过长,污染	样品应保持新鲜,或低温保存,防止污染
	洗涤液配制有误或直接误用浓缩洗涤液	请按说明书配置

声明

1. 该试剂盒可能不适用于一些实验本身有效性不确定的特殊实验样品的检测,例如,基因敲除实验等.某些天然蛋白或者重组蛋白,包括原核及真核重组蛋白,可能因为与本产品所使用的检测抗体及捕获抗体不匹配,而不被检测出。
2. 本试剂盒未与其他厂家同类试剂盒或不同方法检测同一目的物的产品做对比,所以不排除检测结果不一致的情况
3. 限于现有条件及科学技术水平，尚不能对所有原料进行全面的鉴定分析，本产品可能存在一定的质量技术风险。
4. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及当时的实验环境密切相关，请务必准备充足的待测样品。
5. 为保证实验结果的准确性，请严格按照说明书操作，勿与其他公司试剂混用。
6. 有效期：6 个月。

使用前请仔细阅读说明书并检查试剂组分！