

人轻肽神经丝蛋白（NEFL）检测 酶联免疫试剂盒

本试剂盒用于定量检测指定样本中 NEFL 含量

仅供研究，不用于临床诊断

检测原理:

本试剂盒采用 ELISA 双抗体夹心法原理。用纯化的 NEFL 抗体包被微孔板，向已包被的微孔板中依次加入标准品及待测样本与辣根过氧化物酶（HRP）标记的 NEFL 抗体，使固相载体上形成抗体-抗原-酶标抗体复合物，经过彻底洗涤后加入底物 TMB 显色。TMB 在 HRP 酶的催化作用下转化成蓝色，并在酸的作用下最终转化成黄色。颜色的深浅和样本中的 NEFL 含量呈正相关。用酶标仪 450 nm 波长下测定吸光值（OD 值），通过绘制标准曲线计算样本中 NEFL 浓度。

试剂盒组成:

试剂盒组成	规格（96T）	保存条件
抗体包被板条	8×12	2-8℃保存
冻干标准品	2 支（500pg/支）	2-8℃保存
标准品/样本稀释液	25 ml×1 瓶	2-8℃保存
酶标抗体浓缩液（100×）	120 μl×1 瓶	2-8℃保存
酶标抗体稀释液	15 ml×1 瓶	2-8℃保存
浓缩洗涤液（20×）	25 ml×1 瓶	2-8℃保存
显色底物（避光）	12 ml×1 瓶	2-8℃保存
终止液	6 ml×1 瓶	2-8℃保存
封板胶纸	2 张	

其它实验材料（不提供，但可协助购买）:

1. 酶标仪（主波长 450 nm，参考波长 630 nm）
2. 高精度可调移液器（已校准）及吸头：0.5-10、2-20、20-200、200-1000 μl。

一次检测样本较多时，建议使用多通道移液器。

3. 自动洗板机或洗瓶

4. 37℃ 温箱

5. 双蒸水或去离子水

6. 量筒

7. 微量振荡器

注意事项:

1. 试剂盒保存在 2-8 °C，未用完的标准品，建议丢弃。不可混合使用不同来源或不同批号的试剂盒组分，请在有效期内使用本产品。

2. 浓缩洗涤液低温取出可能会伴有结晶析出，稀释时可在水浴中加热助溶，不影响使用。

3. 各步加样均应使用移液器，并经过校准，以免产生误差。建议一次加样时间最好控制在 5 分钟内，如样本数量较多，推荐使用排枪加样。

4. 请每次测定的同时做标准曲线，最好做复孔。如样本中待测物质含量高于试剂盒检测上限（样本 OD 值大于标准品孔第一孔的 OD 值），请先用样本稀释液稀释一定的倍数（n 倍）后再测定，计算时需乘以总稀释倍数。

5. 为避免交叉污染，在加入不同浓度的标准品、不同样本、不同试剂时谨记及时更换吸头，封板胶纸只限一次性使用。

6. 酶标抗体浓缩液及显色底物请避光保存，显色底物在添加之前，应保持无色，请勿使用已变为蓝色的显色底物。

7. 严格按照说明书的操作进行，试验结果判定必须以酶标仪读数为准。

试剂准备:

1. 试剂回温：请在实验前将试剂盒和待测样本置于室温下回温。

2. 洗涤液配制：根据浓缩洗液的浓缩倍数，用双蒸水或去离子水进行相应倍数稀释后备用。

3. 标准品梯度稀释：取出试剂盒标准品，取 500ul 标准品/样本稀释液至冻干标准品中，静置 15 分钟待其完全溶解后轻轻混匀(浓度为 1000 pg/ml)，然后再取 6

只聚丙烯试管,各加入 250 μl 标准品/样本稀释液 ,依次进行 2 倍稀释即: 1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625 pg/ml 。1000 pg/ml 标准品试管为标准曲线最高点浓度, 标准品/样本稀释液作为标准曲线的零点 (0 pg/ml)。

4.酶标抗体工作液: 根据试验所需用量, 用酶标抗体稀释液将酶标抗体浓缩液进行 100 倍稀释,例如 99 μl 酶标抗体稀释液加 1 μl 酶标抗体浓缩,请于 30 min 内使用 (备注酶标抗体浓缩取量最小为 1 μl , 不能低于 1 μl)。

操作步骤:

1.加样: 根据试验所需用量, 取出相应抗体包被板条, 分别将已配制好的标准品、标准品零点 (标品/样本稀释液) 及待测样本以 100 μl /孔加入实验孔底部, 尽量不触及孔壁, 充分混匀。

2.温育: 用封板胶纸封板后置 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 90 min。

3.洗涤: 小心揭掉封板膜, 弃去液体, 甩干, 每孔加 300 μl 洗涤液, 静置 30 秒后弃去, 如此重复 5 次, 拍干。

4.加酶结合物: 在各实验孔加入酶标抗体工作液 (100 μl /孔)。

5.温育: 用封板胶纸封板后置 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min。

6.洗涤: 小心揭掉封板膜, 弃去液体, 甩干, 每孔加 300 μl 洗涤液, 静置 30 秒后弃去, 如此重复 5 次, 拍干。

7.显色: 每孔加入 100 μl 显色底物, 用封板胶纸封板后室温显色 5-15 min。

8.终止: 每孔加终止液 50 μl (此时蓝色立转黄色)。

9.测定: 用酶标仪 450 nm 波长测定各孔的吸光度 (OD 值), 测定应在加终止液后 5 min 以内进行。

结果判定:

1. 每个标准品和样本的 OD 值减去空白孔的 OD 值, 为最终数值, 如果做复孔, 求其平均值。

2. 使用计算机软件以吸光度 OD 值为纵坐标(Y)，相应的 NEFL 标准品浓度为横坐标(X)，生成相应的标准曲线，样本的 NEFL 含量可根据其 OD 值由标准曲线换算出相应的浓度。若样本 OD 值高于标准品曲线上限，请做适当倍数稀释，计算样本浓度时需乘以相应稀释倍数。

Concentration (pg/mL)	Optical Density (450nm)
1000	3.855
500	1.788
250	0.825
125	0.479
62.5	0.312
31.25	0.194
15.625	0.152
0	0.091

