

Elisa试剂盒使用说明书

Human NGF R/TNFRSF16 ELISA Kit

本试剂盒用于定量检测人血清、血浆或细胞培养上清液等样本中天然和重组NGFR/TNFRSF16浓度。使用前请仔细阅读说明书并检查试剂组分，如有任何疑问请与合肥兰杰柯科技有限公司联系，公司将为您提供强有力的技术支持。



全国统一热线：400-600-4213
www.biosharp.cn

目录

| | |
|---------------|---|
| 一、产品简介 | 2 |
| 二、检测原理 | 2 |
| 三、试剂盒组分 | 3 |
| 四、储存条件 | 3 |
| 五、注意事项 | 3 |
| 六、其它实验材料 | 4 |
| 七、使用说明 | 4 |
| 7.1 样品处理及保存方法 | 4 |
| 7.2 试剂准备 | 4 |
| 7.3 操作步骤 | 5 |
| 7.4 操作流程图 | 6 |
| 7.5 操作要点提示 | 6 |
| 7.6 结果判断 | 6 |
| 八、常见问题分析及解决 | 8 |
| 九、实际加样情况表 | 9 |

Human NGF R/TNFRSF16 (低亲和力神经生长因子受体) ELISA KIT

| 货号 | 名称 | 规格 |
|--------------|---|-----|
| BSEH-163-48T | Human NGF R/TNFRSF16 (低亲和力神经生长因子受体) ELISA KIT | 48T |
| BSEH-163-96T | Human NGF R/TNFRSF16 (低亲和力神经生长因子受体) ELISA KIT | 96T |

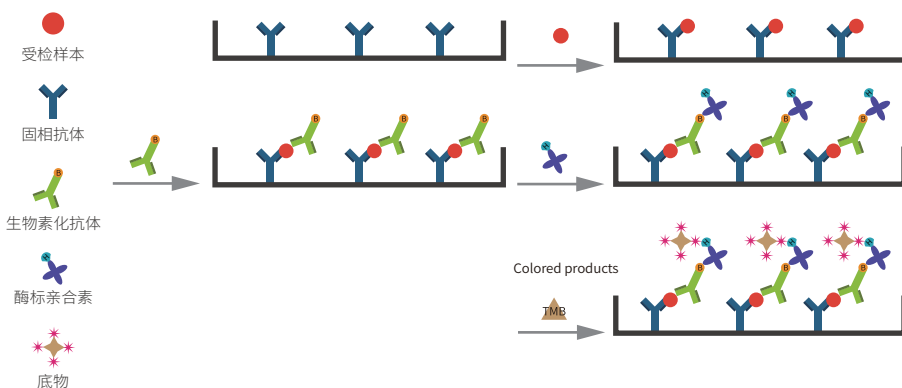
一、产品简介

低亲和力神经生长因子受体 (NGF R) 是一种I型跨膜蛋白,属于肿瘤坏死因子受体家族1,已被命名为TNFRSF16。NGF受体也被称为p75 NTR (神经营养因子受体),因为它与NGF以及其他神经营养因子(包括脑源性神经营养因子、neurotrophin-3和Neurotrophin-4 / 5)的亲和力低。NGF R作为Nogo受体的共受体还与几种髓磷脂衍生蛋白结合。

NGF受体是一种75 kDa的蛋白质,在周围神经的神经元轴突,雪旺氏细胞和神经周围细胞中表达。表达的NGF R的表面分离出了神经干细胞。此外,还证明了神经上皮衍生的NGF受体阳性细胞能够在培养物中分化为神经元,平滑肌和雪旺氏细胞。NGF受体的表达也已用作鉴定间充质前体以及肝星状细胞的标志物。

二、检测原理

本实验采用双抗体夹心ELISA。用抗人NGF R单克隆抗体预包被酶标板,加入适度稀释的样本和标准品,其中的NGF R会与其单抗结合,洗去游离成分;加入生物素化的抗人NGF R抗体,抗人NGF R抗体与结合在单抗上的人NGF R结合而形成免疫复合物,洗去游离的成分;加入辣根过氧化物酶标记的亲合素,生物素与亲合素特异性结合,洗去未结合的酶结合物;加入显色剂,若反应孔中有NGF R,辣根过氧化物酶会使无色的显色剂现蓝色;加终止液变黄。在450nm下测OD值,NGF R浓度与OD₄₅₀值之间呈正比,可通过绘制标准曲线计算出标本中NGF R浓度。



三、试剂盒组成

| 组分编号 | 组分 | 96t | 96t | 储存条件 |
|-------------|------------|------|-----|-------|
| BSEH-163-1 | 标准品 | 2支 | 1支 | -20°C |
| BSEH-163-2 | 标准品和本标稀释液 | 1瓶 | 1瓶 | 2-8°C |
| BSEH-163-3 | 浓缩生物素化抗体 | 2支 | 1支 | 2-8°C |
| BSEH-163-4 | 生物素化抗体稀释液 | 1瓶 | 1瓶 | 2-8°C |
| BSEH-163-5 | 浓缩酶结合物(避光) | 2支 | 1支 | 2-8°C |
| BSEH-163-6 | 酶结合物稀释液 | 1瓶 | 1瓶 | 2-8°C |
| BSEH-163-7 | 浓缩洗涤液 20× | 1瓶 | 1瓶 | 2-8°C |
| BSEH-163-8 | 显色剂(避光) | 1瓶 | 1瓶 | 2-8°C |
| BSEH-163-9 | 终止液 | 1瓶 | 1瓶 | 2-8°C |
| BSEH-163-10 | 抗体包被板条 | 8×12 | 8×6 | 2-8°C |
| BSEH-163-11 | 封板胶纸 | 4张 | 2张 | 2-8°C |
| | 说明书 | 1份 | 1份 | |

四、储存条件

未启封试剂盒2-8°C保存有效期6个月,启封后建议一个月内使用完毕。产品收到后标准品-20°C保存,其它组分2-8°C保存。

五、注意事项

- 1、试剂盒保存在2-8°C,除复溶后的标准品,其它成分不可冷冻。
- 2、浓缩生物素化抗体、浓缩酶结合物装量极少,运输中颠簸和可能的倒置会使液体沾到管壁或瓶盖。使用前请离心处理以使附着于管壁或瓶盖的液体沉积到管底。
- 3、不同批号试剂不可混用。
- 4、为避免交叉污染请使用一次性吸头。
- 5、终止液和显色剂具腐蚀性,避免皮肤及粘膜直接接触,一旦接触到这些液体,请尽快用大量水冲洗。
- 6、使用干净的塑料容器配制洗涤液,使用前充分混匀试剂盒里的各种成份及样品。
- 7、洗涤酶标板时应充分拍干,不要将吸水纸直接放入酶标反应孔中吸水。
- 8、不要用其它来源的试剂混合或替代该产品的组分,不同批号的试剂盒组份不能混用,请在有效日期内使用本产品。
- 9、在试验中标准品和样本检测时建议作双复孔或三复孔,加入试剂的顺序应一致,以保证所有反应孔孵育的时间一样。
- 10、充分混匀对反应结果尤为重要,最好使用微量振荡器(使用最低频率进行振荡)。
- 11、避免操作过程中酶标板干燥,干燥会使酶标板上生物成分迅速失活,影响实验结果。
- 12、适当的稀释样品,使样品值落在标准曲线范围内,根据待测因子含量高、中、低的不同,建议采用1:100、1:10、1:2稀释样品。如果样品OD值高于最高标准,适当增加稀释度并重复检测。
- 13、标准品稀释液,操作人,移液方式,洗涤方法,孵育时间及温度,试剂盒批次的不同均可能会导致结果的差异。
- 14、此法可有效的消除可溶性受体、结合蛋白以及生物样品中的其他因素的干扰。

六、其它实验材料

- 1、酶标仪(450 nm)
- 2、高精度可调移液器及吸头:0.5-10, 2-20, 20-200, 200-1000 μ L;一次检测样品较多时, 最好用多通道移液器
- 3、自动洗板机或洗瓶
- 4、37 $^{\circ}$ C温箱
- 5、双蒸水或去离子水
- 6、坐标纸
- 7、量筒

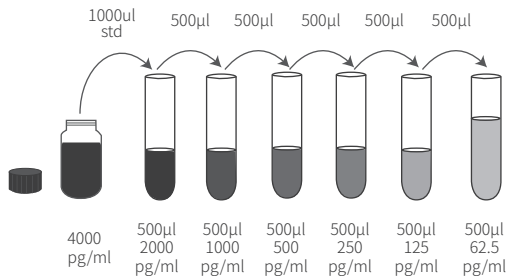
七、使用说明

7.1 样品收集、处理及保存方法

- 1.血清: 使用不含热原和内毒素的试管, 收集血液后, 室温凝血30 min, 1000 \times g离心10 min, 小心分离血清。
- 2.血浆: 用EDTA、柠檬酸盐、肝素作为抗凝剂收集血浆, 收集后30min内以1000 \times g离心15min去除颗粒。
- 3.细胞上清液: 1000 \times g离心10 min去除颗粒和聚合物。
- 4.保存: 若样品不立即检测, 请将其按一次用量分装, -20 $^{\circ}$ C \sim -70 $^{\circ}$ C保存, 避免反复冻融。尽量避免使用溶血或高脂样本。如果血清中含有大量颗粒, 检测前先离心或过滤去除; 室温下解冻, 请勿于37 $^{\circ}$ C或更高的温度加热解冻。
- 5.稀释: 可根据实际情况, 将标本做适当倍数稀释(建议做预实验, 以确定稀释倍数)。

7.2 试剂准备

- 1.提前30 min从冰箱中取出试剂盒, 平衡至室温。
- 2.洗涤缓冲液: 从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶, 这属于正常现象, 加热并轻轻摇晃使结晶完全溶解后再配制。将浓缩洗涤液用双蒸水稀释(1:20)。未用完的放回4 $^{\circ}$ C。
- 3.标准品: 加入标准品/标本稀释液1.0mL至冻干标准品中, 待彻底溶解后, 静置15分钟混匀(浓度为4000pg/mL), 然后根据需要进行稀释, 见下图(建议标准曲线使用以下浓度: 4000、2000、1000、500、250、125、62.5、0pg/mL)。稀释的标准品不得重复使用, 未用完的标准品应按照一次用量分装后, 将其放在-20 \sim -70 $^{\circ}$ C贮存, 一次性使用, 避免反复冻融。



标准品稀释方法

4、生物素化抗体工作液：根据每孔需要100 μ L来计算总的用量，多配制100-200 μ L。以生物素化抗体稀释液稀释浓缩生物素化抗体(1:100)。最好现用现配。

浓缩生物素化抗体稀释方法

| 所用板条数 | 浓缩生物素化抗体 | + | 生物素化抗体稀释液 |
|-------|-------------|---|---------------|
| 12 | 110 μ L | + | 10890 μ L |
| 10 | 90 μ L | + | 8910 μ L |
| 8 | 70 μ L | + | 6930 μ L |
| 6 | 50 μ L | + | 4950 μ L |
| 4 | 33 μ L | + | 3267 μ L |
| 2 | 17 μ L | + | 1683 μ L |
| 1 | 9 μ L | + | 891 μ L |

5、酶结合物工作液：酶结合物稀释液稀释浓缩酶结合物(1:100)。最好现用现配。

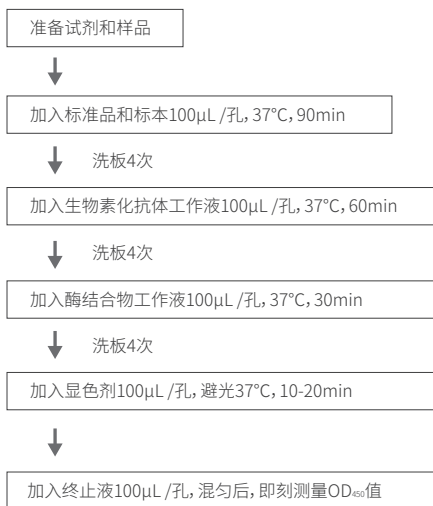
浓缩酶结合物稀释方法：

| 所用板条数 | 浓缩酶结合物 | + | 酶结合物稀释液 |
|-------|-------------|---|---------------|
| 12 | 110 μ L | + | 10890 μ L |
| 10 | 90 μ L | + | 8910 μ L |
| 8 | 70 μ L | + | 6930 μ L |
| 6 | 50 μ L | + | 4950 μ L |
| 4 | 33 μ L | + | 3267 μ L |
| 2 | 17 μ L | + | 1683 μ L |
| 1 | 9 μ L | + | 891 μ L |

7.3 操作步骤

- 1.按照上述准备工作配制好各种溶液。
- 2.根据待测样品数量和标准品的数量决定所需的板条数，并增加1孔作为空白对照孔。分别将标本和不同浓度标准品(100 μ L/孔)加入相应孔中(零孔只加标准品/样本稀释液)，用封板胶纸封住反应孔，37 $^{\circ}$ C孵箱孵育90分钟(空白对照孔除外)。
- 3.洗板4次：(1)自动洗板机：要求注入的洗涤液为350 μ L，注入与吸出间隔15-30秒。(2)手工洗板：甩尽孔内液体，每孔加洗涤液350 μ L，静置30秒后甩尽液体，在厚透吸水纸上拍干。
- 4.加入生物素化抗体工作液(100 μ L/孔)。用封板胶纸封住反应孔，37 $^{\circ}$ C孵箱孵育60分钟(空白对照孔除外)。
- 5.洗板4次。
- 6.加入酶结合物工作液(100 μ L/孔)。用封板胶纸封住反应孔，37 $^{\circ}$ C孵箱孵育30分钟(空白对照孔除外)。
- 7.洗板4次。
- 8.加入显色剂100 μ L/孔，避光，37 $^{\circ}$ C孵箱孵育10-20分钟。
- 9.加入终止液100 μ L/孔，混匀后即刻测量OD₄₅₀值(5分钟内)。

7.4 操作流程图



7.5 操作要点提示

1. 配制各种试剂时要充分混匀, 但要避免产生大量泡沫, 以免加样时加入大量的气泡, 产生加样误差。
2. 为避免交叉污染, 在加入不同浓度的标准品、不同样品、不同试剂时谨记及时更换吸头。
3. 为了确保准确的结果, 在每次孵育前均需使用新封板胶纸封住反应孔。
4. 显色剂在添加之前, 应保持无色, 请勿使用已变为蓝色的显色溶液。最佳显色时间对标准曲线很重要, 肉眼可见前3-4孔有梯度蓝色, 后3-4孔差别不明显, 零孔无蓝色出现即可终止。
5. 每次检测均要做标准曲线, 根据样品待测因子的含量, 适当稀释或浓缩样本, 最好做预实验。

7.6 结果判断

1. 每个标准品和标本的OD值应减去空白孔的OD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NGF R标准品浓度为横坐标(X), 生成相应的标准曲线, 样品的CXCL5/ENA-78含量可根据其OD值由标准曲线换算出相应的浓度。
3. 若标本OD值高于标准曲线上限, 应适当稀释后重测, 计算浓度时应乘以稀释倍数算标本含量。
4. 参考数据:

| 标准品浓度(pg/mL) | OD值1 | OD值2 | 平均值 | 矫正值 |
|--------------|-------|-------|-------|-------|
| 0 | 0.089 | 0.087 | 0.088 | — |
| 62.5 | 0.187 | 0.185 | 0.186 | 0.098 |
| 125 | 0.251 | 0.253 | 0.252 | 0.164 |
| 250 | 0.389 | 0.387 | 0.388 | 0.300 |
| 500 | 0.619 | 0.619 | 0.619 | 0.531 |
| 1000 | 1.022 | 1.023 | 1.023 | 0.935 |
| 2000 | 1.681 | 1.679 | 1.680 | 1.592 |
| 4000 | 2.683 | 2.681 | 2.682 | 2.594 |

八、常见问题分析及解决

| 问题 | 可能原因 | 解决办法 |
|----------------------------|---------------------------------------|--|
| 无颜色 | 不同试剂盒或不同批号的试剂混合 | 重新检查试剂的标签, 确保所有组分都属于正使用的试剂盒中的。不能混用不同试剂盒或不同批号的试剂。 |
| | 漏加酶 | 检查操作流程, 注意不要漏加 |
| | HRP酶污染了叠氮钠 | 使用新配制的试剂, 禁止叠氮钠 |
| 显色弱 | 试剂配制/使用有误 | 重做试验, 严格按说明书操作, 每次配制和使用前看清标签 |
| | 超过有效期的产品可能会产生很弱的信号 | 检查产品有效期 |
| | 缩短孵育时间能使实验信号变弱 | 检查孵育时间 |
| | 使用了被污染的试剂 | 检查试剂是否被污染 |
| | 仪器设定不正确, 滤光片不匹配 | 仪器是否设定正确, 滤光片的使用等 |
| | 洗涤操作不规范 | 洗涤不充分, 使用手工洗板常出现 洗瓶洗涤, 每孔应完全充满洗涤缓冲液, 倾出时应迅速 若用洗板机, 应校准并设定足够充满每孔的体积量。板内侧不应接触设备 检查每孔是否有残留的洗涤液或每孔加样量的体积是否准确 可在两次洗板之间加30秒的浸泡 |
| 高背景 | 实验中孵育温度和时间不适当 | 确定每一试验步骤的孵育温度和时间是否适当 |
| | 酶过量过多 | 加酶前检查移液器调节量是否准确 检查稀释度, 若必要进行效价测定 |
| 全部板子变成规则的蓝色 | 不充分的洗涤/洗涤步骤被遗漏使没结合的HRP仍有残留 | 最好使用洗板机充分洗涤 检查每孔是否有残留的洗涤液或加样量是否准确 |
| | 太多的酶结合物 | 检查稀释度, 必要时进行效价测定 |
| | 封板膜或试剂容器被重复使用, 导致HRP残留, 使TMB底物产生非特异蓝色 | 使用新封板膜, 每步使用不同的试剂容器 |
| 高CV值花板 | 操作不慎或洗涤不充分 | 按说明书洗板、加样和显色, 洗板尤为重要 |
| | 出现干板, 没有使用封板膜、封板膜重复使用 | 确定每一步骤间酶板应保持湿润 使用封板膜封口, 注意每步使用新鲜的封板膜 |
| | 移液器不准确, 吸头重复使用 | 检查并校准移液器, 每次取样必须更换吸头 |
| 标准曲线可得, 但两点之间区别很差 (低或平的曲线) | 酶结合物不足 | 检查稀释度, 必要时进行效价测定 |
| | 检测抗体不足 | 检查稀释度, 必要时进行效价测定 |
| | 板子显色不足 | 延长底物孵育时间 使用推荐品牌的底物溶液 |
| 标准曲线很好, 但没有任何期望的阳性信号 | 标本中无相应的待检测物质 | 使用内参对照 |
| | 标本基质遮盖检测 | 重复实验, 重新考虑实验的相应参数 将标本至少做1:2相应的稀释, 或进行系列稀释 |
| 标准曲线很好, 但标本的判读值很高 | 标本中含的待检测物质水平超过实验范围 | 稀释标本 |
| 边缘效应 | 工作环境温度不均衡 | 避免将板子在变化温度环境中孵育 |
| | 实验过程中出现间断 | 整个实验应连续操作, 在实验开始前将所有的标准品和标本做适当的准备。 |
| 漂移 | 试剂没有按说明书平衡至室温 | 在所有试剂加入孔前, 确保它们已平衡至室温, 除非说明书中有另外的要求。 |
| | 是否可更改试剂盒所提供的操作步骤? | 一般厂商为确保最高的灵敏度, 对试剂盒都进行了优化, 为确保每一试剂盒实验的规范性应按说明书操作。 |
| | 是否可混用不同批次试剂盒中的试剂? | 不可以, 绝大多数试剂在每批试剂盒中是特异的, 若有问题可与厂家或代理商联系。 |
| | 是否可增加或减少标本的体积? | 商品化的试剂盒所需加入的标本体积是优化的, 应按说明书操作, 不建议更改所加标本体积。 |
| | 是否可重新确定自己的标准曲线的点? | 可以。说明书上有建议制备标准曲线时标准品的稀释度, 可改变稀释倍数和增加曲线的点, 但是必须在实验范围内, 高于试剂盒中最高标准品的点和低于灵敏度以下的点是无效的。 |

