

小鼠 β 淀粉样蛋白 1-40(A β 1-40)试剂盒(ELISA)使用说明书

本试剂盒用于体外定量检测血清、血浆、组织匀浆及相关液体样本中 β 淀粉样蛋白 1-40(A β 1-40)的含量。

有效期：6 个月

保存条件：2 - 8℃

本试剂盒仅供科研使用,不得用于临床诊断

实验原理

试剂盒采用双抗体夹心法酶联免疫吸附试验 (ELISA)。往预先包被小鼠 β 淀粉样蛋白 1-40(A β 1-40)捕获抗体的包被微孔中,依次加入标本、标准品、生物素标记的检测抗体,经过温育并彻底洗涤,用底物 TMB 显色,TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色,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小鼠 β 淀粉样蛋白 1-40 (A β 1-40)呈正相关。用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度 (OD 值),计算样品浓度。

样本处理及要求

1. 血清:将收集于血清分离管的全血标本在室温放置 2 h 或 4℃过夜,然后 1100 rpm 离心 20 min,取上清即可,或将上清置于-20℃或-80℃保存,但应避免反复冻融。
2. 血浆:用 EDTA 或肝素作为抗凝剂采集标本,并将标本在采集后的 30 min 内于 2 - 8℃ 1100 rpm 离心 15 min,取上清即可检测,或将上清置于-20℃或-80℃保存,但应避免反复冻融。
3. 组织匀浆:用预冷的 PBS (0.01M, pH7.4) 冲洗组织,去除残留血液(匀浆中裂解的红细胞会影响测量结果),称重后将组织剪碎。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 1 g 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,于冰上充分研磨,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,最后将匀浆液于 5000 rpm 离心 5-10 min,取上清检测。

4. 细胞培养物上清或其它生物标本：请 1100 rpm 离心 20 min, 取上清即可检测, 或将上清置于-20℃或-80℃保存, 但应避免反复冻融。

注：标本溶血会影响最后检测结果, 因此溶血标本不宜进行此项检测。

需要而未提供的试剂和器材

1. 酶标仪 (450nm)
2. 高精度加样器及枪头: 0.5 – 10 μ L、2 – 20 μ L、20 – 200 μ L、200 – 1000 μ L
3. 37℃恒温箱
4. 蒸馏水或去离子水

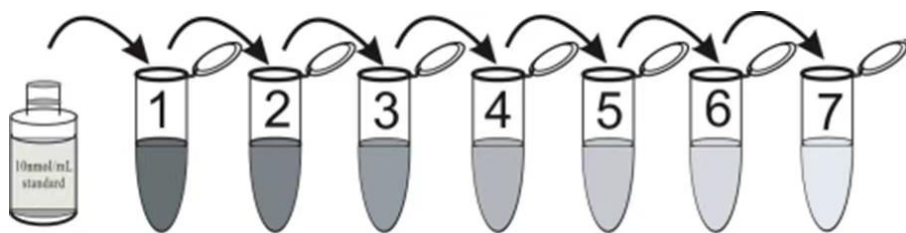
试剂盒组成

名称	配置	保存
微孔酶标板	12 孔 $\times$ 8 条	2-8℃
标准品	1 $\times$ 0.1 mL	-80℃
样本稀释液	1 $\times$ 30 mL	2-8℃
检测抗体	1 $\times$ 0.1 mL	-80℃
二抗	1 $\times$ 0.01 mL	-80℃
10 $\times$ 洗涤缓冲液	1 $\times$ 30 mL	2-8℃
底物显色液 TMB	1 $\times$ 18 mL	2-8℃
终止液	1 $\times$ 8 mL	2-8℃
说明书	1 份	

备注:

1. 标准品溶液

取 7 个新 EP 管, 分别标记 1-7#。在 1#管中加入 990 μ L 样品稀释液, 2-7#管中分别加 500 μ L 样品稀释液。加入 10 μ L 标准品 (1000 ng/mL) 到 1#管中, 剧烈振荡。从 1#管中取去 500 μ L 加入 2#管, 剧烈振荡。同样方法完成 3-7#管的稀释 (1-7#管浓度分别是 100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.56 ng/mL)。稀释好的标准品建议在 15 min 内使用。另外, 标记一个新 EP 管为 B0 (maximum binding, 0 ng/mL), 加入 500 μ L 样品稀释液。



2. 经过大量正常标本检验, 标本的正常浓度值均在试剂盒提供的检测范围内, 实验过程直接取 50 μL 样本上样即可。当有部分样本值超过最大标准品浓度时, 可用样本稀释液将标进行适当稀释后再进行实验。

注意事项

1. 严格按照规定的时间和温度进行温育以保证准确结果。所有试剂都必须在使用前达到室温 20-25 $^{\circ}\text{C}$ 。使用后立即冷藏保存试剂。
2. 洗板不正确可以导致不准确的结果。在加入底物前确保尽量吸干孔内液体。温育过程不要让微孔干燥掉。
3. 消除板底残留的液体和手指印, 否则影响 OD 值。
4. 底物显色液应呈无色或很浅的颜色, 已经变蓝的底物液不能使用。
5. 避免试剂和标本的交叉污染以免造成错误结果。
6. 在储存和温育时避免强光直接照射。
7. 平衡至室温后再打开密封袋以防水滴凝聚在冷板条上。
8. 任何反应试剂不能接触漂白溶剂或漂白溶剂所散发的强烈气体。任何漂白成分都会破坏试剂盒中反应试剂的生物活性。
9. 不能使用过期产品。
10. 所有的样品都应管理好, 按照规定的程序处理样品和检测装置。

试剂准备

试剂盒从冷藏环境中取出应在室温平衡后方可使用。10 $\times$ 洗涤缓冲液的稀释: 蒸馏水按 1: 10 稀释, 即 1 份 10 $\times$ 洗涤缓冲液加 9 份蒸馏水。

操作步骤

1. 从室温平衡 20 min 后的铝箔袋中取出所需板条, 剩余板条用自封袋密封放回 4℃。
2. 设置标准品孔和样本孔, 标准品孔各加不同浓度的标准品 100 μL ; 样本孔中加入待测样本 100 μL , 空白孔不加。37℃恒温箱温育 60 min。
3. 弃去液体, 吸水纸上拍干, 每孔加洗涤液 (250 μL), 静置 1min, 甩去洗涤液, 吸水纸上拍干, 如此重复洗板 3 次 (也可用洗板机洗板)。
4. 每孔加入检测抗体 100 μL , 37℃恒温箱温育 60 min。
5. 弃去液体, 吸水纸上拍干, 每孔加洗涤液 (250 μL), 静置 1 min, 甩去洗涤液, 吸水纸上拍干, 如此重复洗板 3 次 (也可用洗板机洗板)。
6. 每孔加入 1:2000 倍稀释的二抗 100 μL , 37℃恒温箱温育 60 min。
7. 弃去液体, 吸水纸上拍干, 每孔加洗涤液 (250 μL), 静置 1min, 甩去洗涤液, 吸水纸上拍干, 如此重复洗板 4 次 (也可用洗板机洗板)。
8. 每孔加入底物显色液 TMB 100 μL , 37℃避光孵育 15 min。
9. 每孔加入终止液 50 μL , 15 min 内, 在 450 nm 波长处测定各孔的 OD 值。

实验结果计算

以所测标准品的浓度值为横坐标, 标准品的 OD 值为纵坐标, 在坐标纸上或用相关软件绘制标准曲线, 并得到四参数 Logistic 回归方程, 将样品的 OD 值代入方程, 计算出样品的浓度。

试剂盒性能

1. 检测范围: 1.56 ng/mL - 100 ng/mL。
2. 灵敏度: 最低检测浓度 400 pg/ml。
3. 特异性: 不与其它可溶性结构类似物交叉反应。
4. 重复性: 板内变异系数小于 10%, 板间变异系数小于 15%。