

# 人脑源性神经营养因子酶联免疫试剂盒

## Human BDNF ELISA Kit

用于血清, 抗凝血浆, 细胞上清及其他生物体液中

人脑源性神经营养因子的检测

货号: A1010A0191

96 tests

仅供科研使用, 勿用于药物、临床检测

### 检测原理:

本试剂盒采用双抗夹心法。用抗 Human BDNF 抗体包被于酶标板上, 标准品和样本中的 Human BDNF 与单抗结合, 加入生物素化的抗 Human BDNF, 形成免疫复合物连接在板上, 辣根过氧化物酶标记的 streptavidin 与生物素结合, 加入底物工作液显蓝色, 最后加终止液, 在 450nm 处测 OD 值, Human BDNF 浓度与 OD 值成正比, 可通过绘制标准曲线求出标本中 Human BDNF 的浓度。

### 试剂盒组份 (2-8°C 保存)

1. Human BDNF 酶标板 (coated wells), 12\*8wells (单孔可折), 1 plate;
2. Human BDNF 标准品 20 ng (standards), 500ng/ml 标准品, 每支 40 $\mu$ L, 2 vial;
3. Human BDNF 300 $\times$ 生物素化二抗 (Biotinylated Antibody), 40 $\mu$ L, 1 vial;
4. Human BDNF 80 $\times$ 亲和链霉素辣根过氧化物酶结合物 (Streptavidin HRP Conjugate), 150 $\mu$ L, 1 vial;
5. 稀释液 I (Assay Diluent I), 12 mL, 1 vial;
6. 稀释液 II (Assay Diluent II), 12 mL, 1 vial;
7. 稀释液 III (Assay Diluent III), 12 mL, 1 vial;
8. 20 $\times$ 浓缩洗涤液 (Wash Buffer), 50 mL, 1 vial;
9. 显色液 A (Color Reagent A), 6 mL, 1 vial;
10. 显色液 B (Color Reagent B), 6 mL, 1 vial;
11. 终止液 (Stop Solution), 12 mL, 1 vial;

### 未提供的试剂、仪器和耗材:

1. 单道或多道 (8 道或 12 道) 移液器及移液器枪头: 10-200 $\mu$ L 和 50-1000 $\mu$ L;
2. 多道 (8 道或 12 道) 移液器试剂存放槽;
3. EP 管及试剂配置容器;

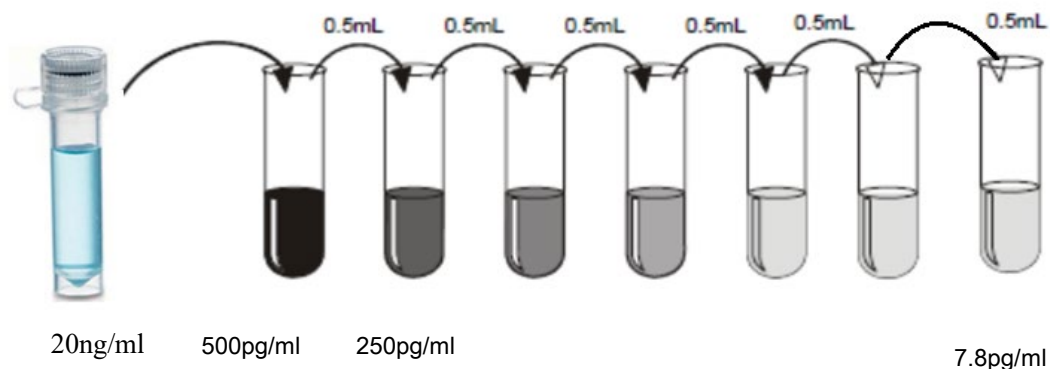
4. 圆柱形量筒：100mL，200mL，500mL 和 1L；
5. 可在 450nm 处进行读数的酶标仪；洗瓶或自动洗板机；
6. 蒸馏水或去离子水；封板膜或板盖；乳胶手套；吸水纸；

### 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°C。使用后立即冷藏保存试剂。
2. 洗板不正确会导致不准确的结果。在加入底物前确保尽量吸干孔内液体。温育过程中不要让微孔干燥掉。
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. 任何反应试剂不能接触漂白溶剂或漂白溶剂所散发出来的强烈气体。任何漂白成分都会破坏试剂盒中反映试剂的生物活性。
8. 标准孔及待测样本均建议做复孔，每次测定应同时做标准曲线，请合理安排预实验。
9. 不能使用过期产品。

### 样本与试剂准备：

1. **样本：**本试剂盒可检测血清，血浆（EDTA，肝素抗凝），细胞培养上清液，组织匀浆等生物学样本。样本储存要求 2-8°C 保存 48 小时以内，更长时间需冷冻（-20°C 或 -80°C）保存，避免反复冻融。如样本 Human BDNF 含量过高，可用稀释液 I 进行稀释。
2. **标准品配制：**一只标准品共 20ng，浓度为 500ng/ml 标准品，每支 40 $\mu$ L。混匀，离心，吸取 5ul 标准品，加入 1ml 的稀释液 I 中，得到 2500pg/ml 浓度的标准品母液；吸取 200ul，加入到 800ul 的稀释液中，配成浓度为 500pg/mL 的标准品溶液（标准曲线最高点）；再准备六支空 EP 管，分别加入 500 $\mu$ L 稀释液 I，吸取 500pg/mL 的标准品溶液 500 $\mu$ L 加入第一管中，充分混匀，从第一管中取 500 $\mu$ L 加到第二管中，充分混匀，如此反复对半稀释至浓度 7.8pg/mL 的标准品溶液；另取一空白 EP 管加入足量的稀释液 I，设为空白对照。



3. **1×Biotinylated Antibody** : 用稀释液 II 按 1:300 倍稀释 300×生物素化二抗。
4. **1×Streptavidin-HRP Conjugate** : 用稀释液 III 按 1:80 倍稀释 80×亲和链霉素辣根过氧化物酶结合物。
5. **显色液配制** : A 液和 B 液做 1 : 1 配制, 即配即用, 可根据使用量临时配制 ( 使用前 15 分钟内配制 ), 不要配制过多的显色液。
6. **1×洗涤液配制** : 用蒸馏水 1 : 20 倍稀释 ( 示例 : 1mL 20×浓缩洗涤液加入 19mL 蒸馏水 ) ;

### 操作步骤 :

血清样本推荐 500 倍稀释 ( 正式实验前建议预实验确定您样本的稀释倍数 ) ; 抗凝血浆样本需进行预实验确认稀释倍数 ; 其他样本, 如细胞上清, 细胞裂解液, 脑脊液, 以及其他生物学样本均需要在正式实验前预实验确认稀释倍数 ;

酶标板是 12\*8wells 的 lockwell 形式, 属于单孔可折形式, 可以按照自己的需要每次折下相应的板条来进行实验 ; 如果第一次使用 biotnt 的这款试剂盒, 建议您在进行大批量实验之前先进行预实验 ;

预实验方式 : 选用 1 条酶标板, 加入标准品 500pg/ml , 7.8pg/ml , 0 孔 ; 另外, 再选择您待测的两个样本, 第一个样本选择三个稀释梯度 ; 第二个样本选择两个稀释梯度来进行预实验 ;

实验步骤 :

1. 加样 : 加入相对应标准品 100 $\mu$ L , 加入待测样品 50 $\mu$ L、稀释液 I 50ul ( 样本已经稀释 2 倍回归计算时需乘以稀释倍数 2 ) , 封板, 充分混匀, 室温温育 120 分钟 ;
2. 洗板 : 用 1×洗涤液将反应板充分洗涤 3 次, 在吸水纸上拍干 ;
3. 每孔加入已稀释 1× Biotinylated Antibody 100 $\mu$ L , 封板, 室温温育 60 分钟 ;
4. 洗板 : 同第二步 ;
5. 每孔加 1×Streptavidin- HRP 100 $\mu$ L , 封板, 室温温育 30 分钟 ;
6. 洗板 : 同第二步 ;
7. 每孔加入已配制的显色工作液 100 $\mu$ L , 将反应板置暗处室温 5-15 分钟, 目测标准品和样本的板孔变为蓝色, 酶标仪 620-630nm 进行读数并保存 ( 第一次数据 ) , 标准品

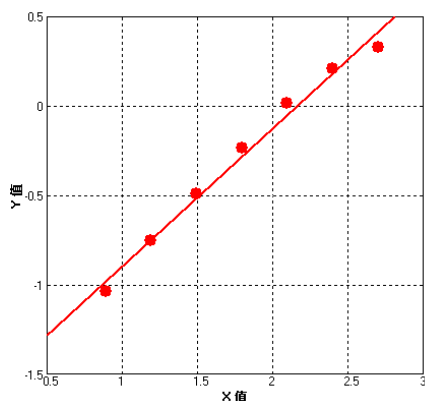
孔的最高点读数 OD 值在 0.7-1.0 之间, 可以进行下一步终止反应;

8. 每孔加入 100 $\mu$ L 终止液, 混匀; 如果颜色呈现绿色或者颜色的变化明显不均匀, 请轻轻叩击板框, 充分混匀。
9. 在 5 分钟内进行酶标仪读数, 设置双波读数 ( 第二次数据 ), 酶标仪主波长 450nm, 副波长 620-630nm 检测吸光度。校准后的 OD 值为 450 nm 的测定值减去 620-630 nm 的测定值。仅使用 450 nm 测定会导致 OD 值偏高, 并且准确度降低。
10. 如果酶标仪没有 620-630nm 的波长, 也可以根据酶标仪的情况选择 570-650nm 的波长作为替代。

### 结果计算与判断:

1. 所有 OD 值都应减除空白值后再计算; 先计算 450-630nm 的数据 ( 第二次数据 );
2. 以标准品 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6, 7.8, 0pg/mL 为横坐标, 450-630nm 的 OD 值为纵坐标, 画出标准曲线。
3. 根据样本 OD 值在该曲线图上查出相对应 Human BDNF 含量, 如样本有稀释, 请再乘上稀释倍数。如果样本没有进行预稀释, 则稀释倍数为 2。计算出的数值应该乘以 2。
4. 推荐采用双对数方式进行数据拟合。如下是示例数据:

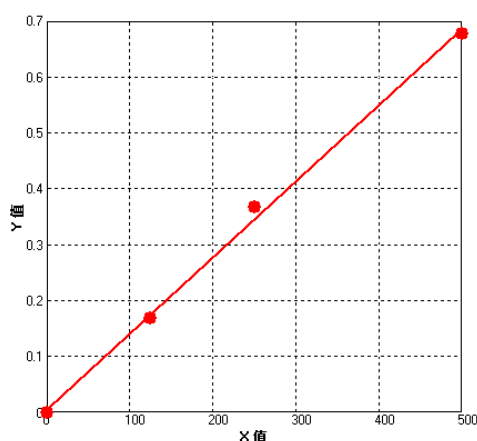
Standard (pg/mL)	O.D. (450 nm-630nm)	Mean	Zero Standard Subtracted
500 pg/ml	2.314,2.222	2.2680	2.1100
250 pg/ml	1.763,1.768	1.7655	1.6075
125 pg/ml	1.191,1.18	1.1855	1.0275
62.5pg/ml	0.742,0.743	0.7425	0.5845
31.3pg/ml	0.482,0.48	0.4810	0.3230
15.6pg/ml	0.334,0.336	0.3350	0.1770
7.8pg/ml	0.249,0.25	0.2495	0.0915
0 pg/ml	0.159,0.157	0.1580	0.0000



Human BDNF 标准曲线 ( pg/mL )

5. 如果样本 OD 值超过标准曲线的最高点, 使用第二次数据结果会不准确, 我们采用第一次数据来进行数据计算;

Standard (pg/mL)	O.D. (630 nm)	Mean	Zero Standard Subtracted
500 pg/ml	0.712 , 0.718	0.715	0.678
250 pg/ml	0.401,0405	0.403	0.366
125 pg/ml	0.202,0.210	0.206	0.169
0	0.036,0.038	0.037	0



Human BDNF 标准曲线 ( pg/mL ) ( 630nm 读数 )

样本第一次读数小于 2.0 OD ( 630nm ) 的, 可以用这个标准曲线进行计算, 得到相对准确的结果; OD 如果超过 2.0, 建议样本稀释以后重新测定;

**试剂盒数据批内差 ( Intra-Assay ) :**

选取不同浓度的血浆样本各 3 例在同一次验证实验中加样 20 孔, 来验证批内差, 检测结果如下:

Sample	1	2	3
N	20	20	20
Mean (pg/mL)	15.8	62.8	131.4
Standard Deviation	0.65	1.63	3.02
Coefficient of Variation (%)	4.1	2.6	2.3

**试剂盒数据批间差 ( Inter-Assay ) :**

选取不同浓度的血浆样本各 3 例在 10 次不同的实验中进行检测, 来验证批间差, 检测

结果如下：

Sample	1	2	3
N	10	10	10
Mean (pg/mL)	14.5	66.2	231.7
Standard Deviation	1.26	6.42	19.69
Coefficient of Variation (%)	8.7	9.7	8.5

#### 试剂盒灵敏度 ( Sensitivity ) :

本试剂盒检测 Human BDNF 的最低浓度为 2.6pg/mL，验证实验选取两条标准品进行梯度稀释确认 2.6pg/mL 以上浓度的反应孔 OD 值呈正相关线性分布，BDNF 浓度在 2.6 - 7.8pg/mL 之间样本可以被检测到但会有较大偏差，低于 2.6pg/mL 无法被检出。

#### 试剂盒数据回归性 ( Recovery ) :

选取血清、血浆、细胞上清等不同类型的人样本按低浓度、中浓度、高浓度分组稀释做回归性验证实验，将线性回归后的浓度值与理论浓度值相比较统计结果如下：

样本类型	Average Recovery	Average Recovery	Average Recovery
血清	106.35%	101.11%	96.89%
血浆	104.47%	97.78%	89.86%
细胞上清	95.23%	88.33%	81.35%

#### 试剂盒数据特异性 ( Specificity ) :

本 ELISA 试剂盒可以检测自然或重组 Human BDNF 蛋白。试剂盒与 Mouse BDNF 及 Rat BDNF 有交叉反应。