

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℃保存)

- 1. Human BDNF 酶标板 (coated wells), 12*8wells (单孔可折), 1 plate;
- 2. Human BDNF 标准品 10 ng (standards), 10ng/ml 标准品, 每支 100 μL, 2 vial;
- 3. Human BDNF 120×生物素化二抗 (Biotinylated Antibody), 100 μL, 1 vial;
- 4. Human BDNF 300×亲和链霉素辣根过氧化物酶结合物(Streptavidin HRP Conjugate),100 μL, 1 vial;
- 5. 稀释液 I (Assay Diluent I), 30 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×浓缩洗涤液(Wash Buffer), 30 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;
- 12. 封板膜, 3张;

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 μL和 50-1000 μL;
- 2. 多道(8道或12道)移液器试剂存放槽;

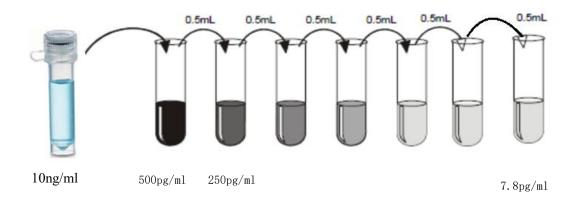
- 3. EP 管及试剂配置容器;
- 4. 圆柱形量筒: 100mL, 200mL, 500mL 和 1L;
- 5. 可在 450nm 处进行读数的酶标仪; 洗瓶或自动洗板机;
- 6. 蒸馏水或去离子水; 封板膜或板盖; 乳胶手套; 吸水纸;

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℃。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℃保存 48 小时以内,更长时间需冷冻(-20℃或-80℃)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 10ng/ml 标准品,每支 100 μL。混匀,离心,吸取 20ul 标准品,加入 380ul 的稀释液 I 中,得到 500pg/ml 浓度的标准品溶液 (标准曲线最高点);再准备六支空 EP 管,分别加入 500 μL 稀释液 I,吸取 500pg/mL 的标准品溶液 200 μL 加入第一管中,充分混匀,从第一管中取 200 μL 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 1:120 倍稀释 120×生物素化二抗。
- 4. 1×Streptavidin-HRP Conjugate: 用稀释液 III 按 1:300 倍稀释 300×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拆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;**血清样本建议稀释倍数 20-200 倍**

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 μL,加入待测样品 100 μL, 封板,充分混匀,37℃温育 90 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 µL, 封板, 室温温育 60 分钟;
- 4. 洗板: 同第二步;
- 5. 每孔加 1×Streptavidin-HRP 100 µL, 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 μ L, 将反应板置暗处室温 5-15 分钟, 每隔一段时间, 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 0D 值如果超过 0.8,请及早终止。如果标准品最高点读

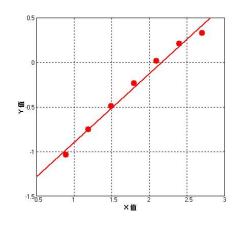
- 数没有超过 0.4, 可以延长室温温育时间为 30min, 再进行下一步终止反应。
- 8. 每孔加入 100 µL 终止液,混匀;如果颜色呈现绿色或者颜色的变化明显不均匀,请轻轻叩击板框,充分混匀。
- 9. 在 5 分钟内进行酶标仪读数,设置双波读数(第二次数据),酶标仪主波长 450nm,副 波长 620-630nm 检测吸光度。校准后的 0D 值为 450 nm 的测定值减去 620-630 nm 的测定值。仅使用 450 nm 测定会导致 0D 值偏高,并且准确度降低。
- 10. 如果酶标仪没有 620-630nm 的波长, 也可以根据酶标仪的情况选择 570-650nm 的波长作为替代。

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。	加下是示例数据:
т.		

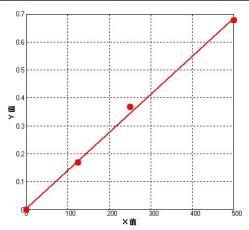
Standard (pg/mL)	O.D. (450 nm-630nm)	Mean	Zero Standard Subtracted (Std.)-(S1)
500 pg/ml	2. 314, 2. 222	2. 2680	2.1100
250 pg/ml	1. 763, 1. 768	1. 7655	1.6075
125 pg/ml	1. 191, 1. 18	1. 1855	1.0275
62.5pg/ml	0. 742, 0. 743	0.7425	0. 5845
31.3pg/ml	0. 482, 0. 48	0.4810	0. 3230
15.6pg/ml	0. 334, 0. 336	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	0.D. (630 nm)	Mean	Zero Standard
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 0D (630nm) 的,可以用这个标准曲线进行计算,得到相对准确的结果; 0D 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
SD (pg/mL)	0.65	1.63	3.02
C V (%)	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
SD (pg/mL)	1. 26	6. 42	19.69
C V (%)	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 0D 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。