

(仅供科研使用，不得用于临床诊断!)

人轻肽神经丝蛋白(NEFL) 定量检测试

剂盒 (ELISA) 使用说明书 规格:

96T/48T 货号: SYP-H0206

用途: 用于检测血清、血浆、细胞培养上清液等样本中人轻肽神经丝蛋白(NEFL)的浓度。

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

官方热线：400-999-8863

技术电话：18358180525

邮箱：UpingBio@163.com

公司网址：www.upingbio.com 具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。联系时请提供产品货号、生产日期（见盒签），以便我们更高效为您服务。

【试剂盒性能】

物理性能：各液体组分澄清透明、无沉淀或者絮状物。微孔板铝箔袋应真空包装，无破损漏气。

校准曲线线性：校准品剂量反应曲线相关系数 r 值，大于等于 0.9900。**精密度：**批内变异系数 CV% 小于 10%；批间变异系数 CV% 小于 15%。**灵敏度：**最低检出剂量小于 7.812 pg/mL。

回收率：回收率在 85%-115% 之间。

敏感性：本试剂盒识别天然人轻肽神经丝蛋白(NEFL)，与结构类似物无交叉。

稳定性：2°C-8°C 保存，有效期 6 个月。

检测范围：31.25 pg/mL - 1000 pg/mL。

【实验原理】

本试剂盒采用双抗体夹心法酶联免疫吸附试验（ELISA）。在预包被抗人轻肽神经丝蛋白(NEFL)抗体（固相抗体）的微孔酶标板中，加入人轻肽神经丝蛋白(NEFL)校准品和待测样本，再加入生物素标记抗体，经过温育与充分洗涤后，再加入 HRP 偶联的亲合素，经过温育与充分洗涤，去除未结合的组分，在微孔板固相表面形成固相抗体-抗原-生物素标记抗体-亲和素酶的夹心复合物。加 TMB 显色液，产生蓝色产物，在终止液作用下，最终转化为黄色，在酶标仪 450nm 波长上测定吸光度（OD 值），吸光度（OD 值）与待测样品中人轻肽神经丝蛋白(NEFL)的浓度正相关。拟合校准品曲线，可以计算出样本中人轻肽神经丝蛋白(NEFL)的浓度。

【试剂盒组分与保存】

组分		数量	主要成分
校准品	High Standard	2 vial	校准品冻干粉
校准品复溶液	Reconstitution	2 vial	PBS
校准品 & 样本稀 释液	Standard & Sample Diluent	25mL	PBSTN
包被微孔板	Microelisa Stripplate	96T/48T	预包被固相抗体
生物素抗体	Bio-Antibody	10mL	生物素抗体
HRP 标记亲和素	HRP- Conjugate	10mL	HRP 标记亲和素
TMB 显色液	TMB	10mL	TMB
终止液	Stop Solution	6mL	酸性溶液
20×浓缩洗涤液	20X Wash Solution	25mL	0.05%Tween20
说明书	说明书	1 份	--
自封袋	自封袋	1 个	--
不干胶	不干胶	4 片	--

注意：1、使用前请检查试剂盒中试剂的标签和数量与表格是否一致。

2、试剂盒 2-8℃保存，不得使用过期试剂盒。

3、包被微孔板单次未使用完，要谨记密封放到 2-8℃保存。

4、复溶后的校准品仅限当天使用。

5、如果试剂盒的组份需要再次使用，请确保上一次使用之后没有被污染。

试验所需自备试验器材 (不提供, 但可协助购买)

- 1、标准规格酶标仪。
- 2、自动洗板机。
- 3、振荡器。
- 4、系列可调节移液器及吸头, 一次检测样品较多时, 最好用多通道移液器。

【试剂盒限制性】

- 1、仅供科研使用, 不得用于临床诊断。
- 2、在试剂盒标示的有效期内使用, 过期产品不得使用。
- 3、跟其他厂家的试剂盒或者组分不能混用。
- 4、使用试剂盒配套的样品稀释液。
- 5、如果样本值高于最高校准品浓度值, 请将样本适当稀释后, 再重新测定。
- 6、待测样本中存在的人抗鼠等异嗜抗体会干扰检测结果, 检测前, 请排除该因素。
- 7、通过其他方法得到的检测结果, 与本试剂盒测定结果不具有直接的可比性。

【注意事项】

- 1、本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断。
- 2、试验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。特别是检测血液或者其他体液样品时，请按国家生物实验室安全防护条例执行。
- 3、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。
- 4、洗板不正确可能导致不准确的结果。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。
- 5、消除板底残留的液体和手指印，否则影响 OD 值。
- 6、底物显色液应呈无色或很浅的颜色。
- 7、避免试剂和标本的交叉污染以免造成错误结果。
- 8、在储存和温育时避免强光直接照射。
- 9、平衡至室温后再打开密封袋以防水滴凝聚在冷板条上。
- 10、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。

11、检测使用的酶标仪需要安装能检测 450±10nm 波长的滤光片，

光密度范围在 0-3.5 之间。建议使用时提前 15 分钟预热。

12、请勿使用其他批号或其他来源的试剂混合或替代本试剂盒中的试剂。

13、试验中所用的 EP 管和吸头均为一次性使用，严禁混用。

14、请勿使用过期的试剂。

【样品的准备和保存】

以下只是列出样品采集和保存的一般指南。所有样本采集保存过程中，不得使用叠氮钠做为防腐剂。样品如果不立即分析，应分装后冷冻保存，且避免反复冻融。

细胞培养上清：离心去除沉淀，立即分析或分装后-20℃冷冻保存。

血清：用干净试管收集血液，室温凝固 30 分钟，离心 2000×g 20 分钟，收集血清。立即分析或分装后-20℃冷冻保存。

血浆：采用肝素、柠檬酸盐或 EDTA 抗凝，抽血后 30 分钟内在 2-8℃离心 2000×g 20 分钟。为消除血小板的影响，建议在 2-8℃进一步离心 10000×g 10 分钟。立即分析或分装后-20℃冷冻保存。

细胞裂解液：对于贴壁细胞，去除培养液，用 PBS、生理盐水或无血

清培养液洗一遍。加入适量裂解液，用移液器吹打数下，使裂解液和细胞充分接触。通常 10 秒后，细胞就会被裂解。对于悬浮细胞，离心收集细胞，用 PBS、生理盐水或无血清培养液洗一遍。加入适量裂解液，用移液器吹打把细胞吹散，用手指轻弹以充分裂解细胞。充分裂解后，10000—14000×g 离心 3-5 分钟，取上清。立即分析或分装后-20℃冷冻保存。

尿液：用无菌管收集，离心 2000×g 20 分钟。仔细收集上清。如有沉淀形成，应再次离心。

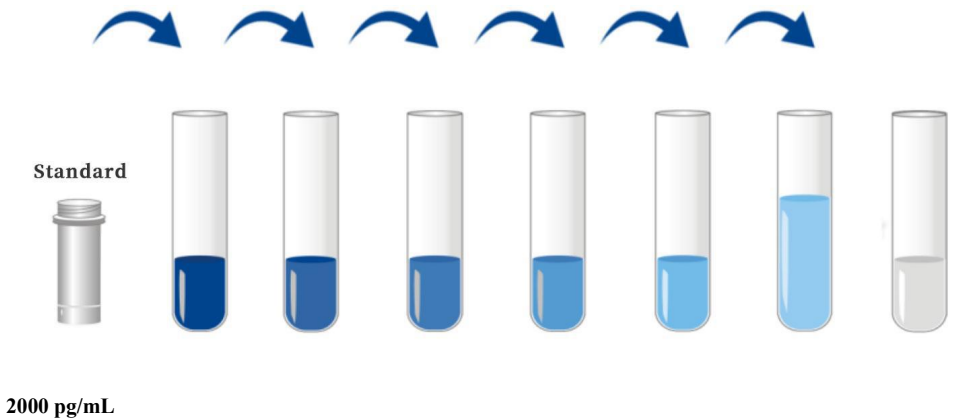
【试剂准备】

- 1、使用前，所有的组分都要至少复温 120min，确保充分复温到室温。
- 2、浓缩洗涤液：从冰箱取出的浓缩洗涤液，会有结晶产生，这属于正常现象，水浴加热使结晶完全溶解。浓缩洗涤液与蒸馏水，按 1:20 稀释，即 1 份的浓缩洗涤液，添加 19 份的蒸馏水。

【校准品稀释方法】

校准品重溶步骤：用校准品复溶液重溶校准品，将一瓶校准品复溶液中的液体，全部加入到一瓶的校准品冻干粉中，轻柔地涡旋震荡，确保充分混匀，重溶后校准品的母液浓度为 **2000 pg/mL**，稀释前充分混匀。

校准品母液稀释步骤：稀释前校准品工作液静置 1-2 分钟，用校准品 & 样本通用稀释液将校准品母液进行倍比稀释，倍比稀释方法：取 7 支 EP 管，每管中加入 500 μL 校准品 & 样品稀释液，从 2000 pg/mL 的校准品母液中吸取 500 μL 到第一支 EP 管中混匀配成 1000 pg/mL 的校准品工作液，按此步骤往后依次吸取混匀。如下页图示。



校准品建议稀释浓度：建议配制成以下浓度：**1000、500、250、125、**

62.5、31.25、0 pg/mL，并作为拟合标曲的校准品浓度值。

提示：最后一管直接加入校准品&样本通用稀释液作为0值，不需要再从倒数第二管中吸取液体。倍比稀释的校准品工作液需要现配现用。

【操作程序】

推荐样本稀释方案：建议老师先做预实验摸索样本最佳稀释倍数，然后再做正式实验。

所有试剂和组分都先恢复到室温，校准品、质控品和样品，建议做复孔。

- 1、按前面说明书描述的方法，配制好试剂盒各种组分的工作液。
- 2、从铝箔袋中取出所需板条，剩余的板条用自封袋密封放回冰箱。
- 3、设置校准品孔、样本稀释液孔、空白孔和样本孔，校准品孔各加不同浓度的校准品 50 μ L，样本稀释液孔加样本稀释液 50 μ L，空白孔不加，样本孔加待测样本 50 μ L。除空白孔外，每孔加入生物素抗体 100uL，用封板膜盖住反应板，37 $^{\circ}$ C水浴锅或恒温箱避光温育 60min。

- 4、揭开封板膜，弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液，静置

UpingBio technology Co.,Ltd

1 minute, shake off the washing liquid, pat dry on absorbent paper, repeat this 5 times. If you use an automatic plate washer, please wash the plate according to the operating procedures of the plate washer. Adding a soaking program for 30 seconds can improve the detection accuracy. After washing the plate and before adding substrate, pat the reaction plate dry on clean, lint-free paper.

5. Except for the blank wells, add 100uL of HRP-labeled avidin to each well, cover the reaction plate with a sealing film, and incubate in a 37°C water bath or incubator in the dark for 20 minutes.

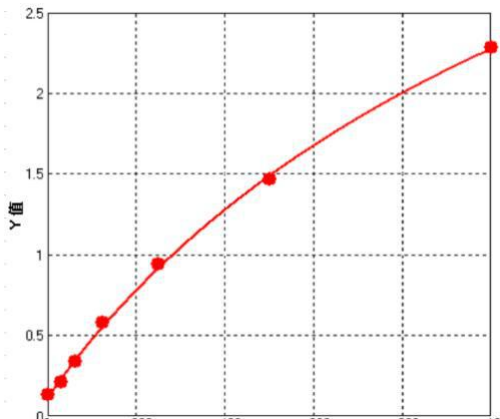
6. Repeat step 4.

7. Add 100μL of TMB chromogenic solution to all wells. Cover the reaction plate with sealing film and incubate in a 37°C water bath or incubator in the dark for 15 minutes.

8. Add 50 μL of stop solution to all wells, and read the absorbance (OD value) of each well on a 450 nm wavelength microplate reader.

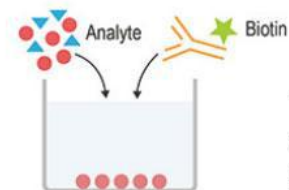
【Result calculation】

1. Use the concentration of the calibrator as the abscissa and the corresponding absorbance (OD value) as the ordinate. Use computer software and four-parameter Logistic curve fitting (4-pl) to create a standard curve equation. Through the absorbance (OD value) of the sample value), use the equation to calculate the concentration value of the sample. [Calculation using ELISA Calc software] 2. If the sample is diluted, the concentration value measured by the above method must be multiplied by the dilution factor to obtain the final concentration of the sample.



(Schematic diagram, for reference only)

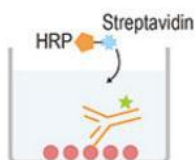
[Operation Summary]



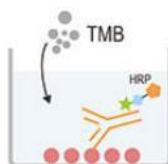
1、反应板孔中加入50uL校准品工作液或样本后,立即每孔加入100uL生物素化抗体工作液, 37°C孵育60分钟。



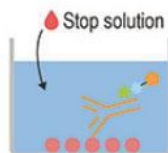
2、弃掉板内液体, 洗板5次。



3、每孔加入100uL HRP酶结合物工作液 37°C孵育20分钟, 弃掉板内液体, 洗板5次。



4、每孔加入100uL TMB显色液, 37°C孵育 15分钟。



5、每孔加入 50uL 终止液。



6、立即在 450nm波长下读数, 处理数据。

【problem analysis】

Problem Description	Possible Causes	Corresponding
Negative and positive control results are unstable	Incorrect liquid	Check pipettes and tips
	Equilibration time is too	Ensure sufficient
	Incomplete washing	Ensure the washing time and number of washes
Very weak or colorless	Incubation time too short	Ensure adequate
	Experimental	Use recommended
	Insufficient reagent	Check the liquid aspiration and addition
	Incorrect dilution	
Enzyme label inactivation or substrate	Mix enzyme conjugate and substrate and check	
Reading value is low	Microplate reader settings are incorrect	Check the wavelength and filter settings on the
		Turn on the microplate
Large coefficient of	Adding fluid incorrectly	Check the filling
High background value	The working	Use the recommended
	Incomplete washing of enzyme plate	Ensure that each step of cleaning is complete; if using an automatic plate washer, please check
	The lotion is	Prepare new lotion
Low sensitivity	Improper storage of ELISA kits	Store relevant reagents according to instructions
	Not terminated before reading	Stop solution should be added to each well

UpingBio technology Co.,Ltd

If the experimental results are not good, please take pictures of the color development results in time, save the experimental data, keep the strips used and unused reagents, and then contact our company's technical support to solve the problem for you.

【statement】

1. Due to existing conditions and scientific and technological level, it is not possible to conduct comprehensive identification and analysis of all raw materials. This product may have certain quality and technical risks.

2. This kit removes/reduces some endogenous interfering factors in biological samples during the development process. Not all possible influencing factors have been removed.

3. The final experimental results are closely related to factors such as the effectiveness of the reagents, the relevant operations of the experimenter, and the experimental environment at the time. Our company is only responsible for the kit itself and is not responsible for the sample consumption caused by the

use of the kit. Please use The user should fully consider the possible usage of the sample and reserve sufficient samples before use.

4. In order to achieve good experimental results, please only use the reagents provided in our company's kits, do not mix products from other manufacturers, and operate in strict accordance with the instructions.

5. Due to incorrect reagent preparation and microplate reader parameter settings during the operation, abnormal results may occur. Please read the instructions carefully and adjust the instrument before the experiment.

Website: www.upingbio.com

Official hotline: 400-999-8863

Supervision phone number:
40150112111

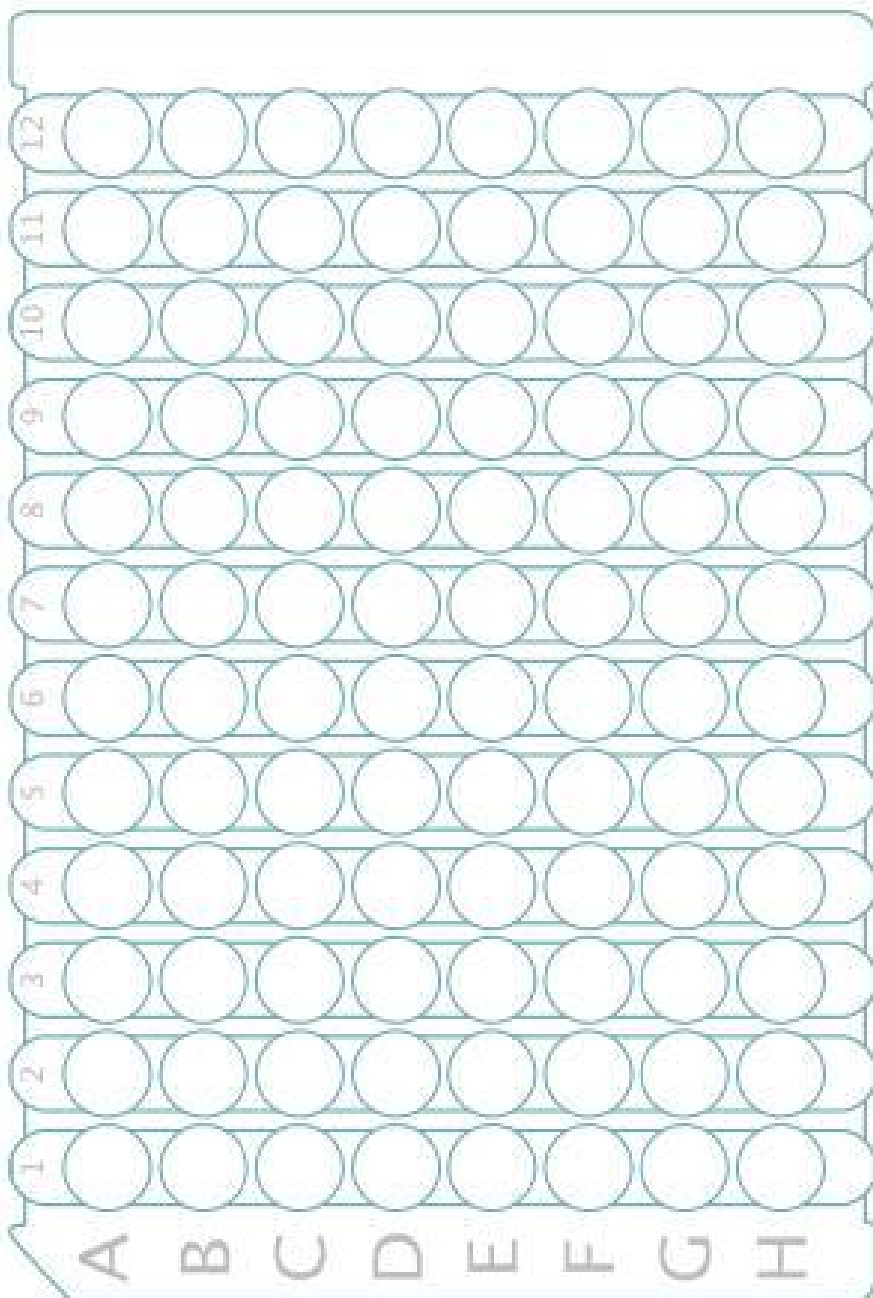
UpingBio technology Co.,Ltd

6. Even if operated by the same personnel, different results may be obtained in two independent experiments. In order to ensure the reproducibility of the results, it is necessary to control every step of the experimental process.

7. The kits will undergo strict quality inspection before shipment. However, due to factors such as transportation conditions, differences in experimental equipment, etc., user test results may be inconsistent with factory data.

8. This kit has not been compared with similar kits from other manufacturers or products using different methods to detect the same target, so inconsistent test results cannot be ruled out.

9、试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。



【实验心得】

【实验心得】