

Mouse NGF β ELISA Kit

小鼠神经生长因子 ELISA 试剂盒

产品编号: EK0470

规格: 96T

检测范围: 31.2pg/ml→2000pg/ml;

特异性: 系统和BDNF、GDNF、CNTF、NT3、NT4无交叉反应。

敏感性: <1pg/ml

保存: 2-8℃ (频繁使用时); -20℃ (长时间不用时)。

有效期: 6个月(4℃); 12个月(-20℃)。

用途: 用于体外定量分析小鼠血清、细胞裂解液、细胞培养上清。

工作原理

Nerve growth factor, NGF。神经生长因子。属于一组对神经元的生长、分化、延长存活期具有促进作用的生长因子家族。包括NGF、BDNF、NT-3、NT-4等。NGF有三种形式: NGF β , 2.5S NGF, 7.5S NGF。NGF β 是两条链非共价键形成的二聚体, 而且是7.5S NGF的三个组分之一。2.5S NGF是两条链共价键形成的二聚体(N端对应C端)。NGF β 和2.5S NGF分子量都是26KDa, 7.5S NGF的分子量为75KDa。试剂盒反映的是NGF β , 2.5S NGF以及7.5S NGF中NGF β 的含量。本试剂盒所用的标准品为重组小鼠NGF β 。

博士德所提供的小鼠NGF ELISA Kit是典型的夹心法酶联免疫吸附测定试剂盒(Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay, ELISA)。预先包被的抗体为和检测相抗体为多克隆抗体。检测相抗体经生物素(biotin)标记。样品和生物素标记抗体先后加入酶标板孔反应后, PBS或TBS洗涤。随后加入过氧化物酶标记的亲合素反应; 经过PBS或TBS的彻底洗涤后用底物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NGF呈正相关。

试剂盒中内容(96孔)

内容	规格	数量
预包被抗小鼠 NGF抗体的96孔板	96T	1板
重组小鼠 NGF冻干标准品	10ng/管	2管
生物素标记抗小鼠 NGF(100X)	100u1	1管
亲和素-过氧化物酶复合物(ABC)(100X)	100u1	1管
样品稀释液	30ml	1瓶
抗体稀释液	12ml	1瓶
ABC稀释液	12ml	1瓶
TMB显色液	10ml	1瓶
终止液	10ml	1瓶
洗涤缓冲液(25X)	20ml	1瓶
封板膜		4张

注意: 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

FOR RESEARCH USE ONLY, NOT FOR DIAGNOSTIC AND CLINICAL USE.

Phone:800-880-8748, (027) 67845390/1/2/3/5

Email:boster@boster.com.cn

Web:www.boster.com.cn

需要而未提供的试剂和器材

1. 标准规格酶标仪。
2. 自动洗板机。
3. 恒温箱
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。
5. 干净的试管和Eppendorf管。
6. 用去离子水将25X洗涤缓冲液稀释25倍，成1X洗涤缓冲液。

注意事项

1. 使用前TMB显色液应为无色透明溶液，若发现颜色异常，请及时与厂家联系。
2. 用户在初次使用试剂盒时，应将各种试剂管离心数分钟，以便试剂集中到管底。
3. 要严格避免操作过程中酶标板干燥。干燥会使酶标板上生物成份迅速失活。
4. 为免交叉污染，要避免重复使用手中的吸头和试管。
5. 禁止混用不同批次试剂盒内的试剂。
6. 本公司提供的96孔酶标板是单条可拆型酶标板，用户可按需求使用；剩余的酶标板请按保存条件贮存。
7. 揭封板膜和覆盖封板膜时应避免用力过大导致液体溅出。

洗板方法

手工洗板方法：吸去（不可触及板壁）或甩掉酶标板内的液体；在实验台上铺垫几层吸水纸，酶标板朝下用力拍几次；将1X洗涤缓冲液至少300ul注入孔内，浸泡1-2分钟。根据需要，重复此过程数次。

自动洗板：如果有自动洗板机，应在熟练使用后再用到正式实验过程中。

样品的准备和保存

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2小时，离心2000×g 20分钟，收集血清。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，用枪吹打数下，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，用枪吹打把细胞吹散，用手指轻弹以充分裂解细胞。充分裂解后，10000—14000g离心3-5分钟，取上清。立即分析或分装后-20℃冷冻保存。

样品稀释的一般原则

用户须估计样品待测因子的含量，决定适当的稀释倍数，以使稀释后样品中待测因子的浓度处于ELISA试剂盒的最佳检测范围。根据待测因子含量高、中、低的不同，分别采取不同的稀释方案：

高——指待测因子在20-200ng/ml。一般按1：100稀释。297ul样品稀释液加3ul样品。

中——指待测因子在2-20ng/ml。一般按1：10稀释。225ul样品稀释液加25ul样品。

低——指待测因子在31.2→2000pg/ml。按1：2稀释。100ul样品稀释液加100ul样品。

特低——指待测因子 $\leq 31.2\text{pg/ml}$ 。样品一般不做稀释，或按1:2稀释。

以上方案仅供参考，样品的稀释应有详细记录。

试剂的准备和保存

A. NGF 标准品的稀释和使用：在使用前2小时内准备。

试剂盒提供2管标准品，每管10ng，每次使用1管。

1. 配制10,000pg/ml标准品：取1ml样品稀释液加入标准品管内，盖好后静置10分钟以上，然后反复颠倒/搓动以助溶解。
2. 配制2000pg/ml标准品：取0.2ml 10,000pg/ml的标准品加入有0.8ml样品稀释液的Eppendorf管中，混匀，做上标记。
3. 配制1000pg/ml→31.2pg/ml标准品：准备6只Eppendorf管，每管加0.3ml样品稀释液，分别标记上1000pg/ml，500pg/ml，250pg/ml，125pg/ml，62.5pg/ml，31.2pg/ml。取0.3ml 2000pg/ml的标准品加入标记1000pg/ml的管中，混匀后同样取出0.3ml，加入下一只管中。余同此类推，直到最后一只样品管。

注意：已经稀释的标准品（10,000pg/ml），应在12小时内使用。-20℃冷冻保存条件下，2天内可以使用，但不得反复冻融。

B. 生物素标记抗小鼠NGF抗体工作液：在使用前2小时内准备。。

1. 根据每孔需要100ul计算总的用量（实际配制时应多配制100-200ul）。
2. 按1ul生物素标记抗小鼠NGF加抗体稀释液99ul的比例配制工作液。轻轻混匀。

C. 亲和素-过氧化物酶复合物（ABC）工作液的准备：在使用前1小时内准备。

1. 根据每孔需要100ul计算总的用量（实配时应多配制100-200ul）。
2. 按1ul亲和素-过氧化物酶复合物（ABC）加ABC稀释液99ul的比例配制工作液。轻轻混匀。

操作程序

已稀释好的ABC和TMB显色液在加入酶标板孔前都应预先在37℃中平衡至少30分钟。试剂或样品稀释时，**切不可忘记混匀**。每次检测都应该做标准曲线。用户须估计样品待测因子的含量，决定适当的稀释倍数。

1. 确定本次检测所需的已包被抗体的酶标板孔数目，并增加1孔作为TMB空白显色孔。总数=样品数+9；做双份检测时 $\times 2$ 。其余重包装好放入冰箱中。
2. 将2000pg/ml，1000pg/ml，500pg/ml，250pg/ml，125pg/ml，62.5pg/ml，31.2pg/ml的标准品各100ul依次加入一排7孔中，1孔只加样品稀释液的作为零孔。对于血清、细胞裂解液、细胞培养上清，每孔加100ul已用样品稀释液稀释的样品。
3. 酶标板加上封板膜，37℃反应90分钟。
4. 反应后用自动洗板机吸去酶标板内的液体；或甩去酶标板内液体，再对着吸水纸拍几下。**不洗**。
5. 将准备好的生物素抗小鼠NGF抗体工作液按每孔100ul依次加入（TMB空白显色孔除外）。

酶标板加上封板膜，37℃反应60分钟。

6. 1X洗涤缓冲液洗涤3次，每次浸泡1分钟左右（每孔洗液至少300ul）。
7. 将准备好的ABC工作液按每孔100ul依次加入（TMB空白显色孔除外）。酶标板加上封板膜，37℃反应30分钟。
8. 1X洗涤缓冲液洗涤5次，每次浸泡1-2分钟左右（每孔洗液至少300ul）。
9. 按每孔90ul依次加入TMB显色液，37℃避光反应15-20分钟。
（注意：显色时间供参考，因用户实验室条件差异，最佳显色时间会有所不同。此时肉眼可见标准品的前3-4孔有明显的梯度蓝色，后3-4孔差别不明显）。
10. 按每孔100ul依次加入终止液，此时蓝色立转黄色。
11. 用酶标仪在450nm测定O.D. 值。

有两种设定空白对照的方案：

（1）将TMB空白显色孔（只加TMB显色液和终止液）设为对照。所有的标准品和样品的吸光值减去TMB空白显色孔的吸光值后，在坐标纸上画出曲线，以吸光值作为纵坐标，以浓度作为横坐标。

（2）将零孔设为对照。所有的标准品和样品的吸光值减去零孔的吸光值后，得到的数据可以直接在坐标纸上画出曲线。

12. 根据样品的吸光值在坐标上找出对应的浓度。用户也可以使用各种应用软件来计算。应记住由于样品稀释了N倍，其实际浓度应该×N。

操作程序总结：

1. 加样品和标准品，37℃反应90分钟。不洗。
2. 加生物素标记抗体，37℃反应60分钟。1X洗涤缓冲液洗涤3次。
3. 加ABC，37℃反应30分钟。1X洗涤缓冲液洗涤5次。
4. TMB37℃反应15-20分钟。
5. 加入终止液，读数。

典型数据

TMB37℃反应15分钟。

（数据供参考，不同用户最佳显色时间会有所不同）

浓度	0.0pg/ml	31.2pg/ml	62.5pg/ml	125pg/ml	250pg/ml	500pg/ml	1000pg/ml	2000pg/ml
	1	1	1	1	1	1	1	1
O.D.	0.094	0.236	0.325	0.531	0.875	1.376	1.983	2.531

参考文献

1. Thoenen H, and Edgar D. Neurotrophic factors. Science. 1985 Jul 19;229(4710):238-42.
2. Cuellar AC, Garofalo L, Kenigsberg RL, Maysinger D. Gangliosides potentiate in vivo and in vitro effects of nerve growth factor on central cholinergic neurons. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Mar;86(6):2056-60.