

大鼠载脂蛋白E2 (Apo-E2) ELISA KIT

英文名称： Rat (ceramide) ELISA KIT

规格： 96T

货号： NLR462

尊敬的客户:

感谢您选用本公司 ELISA 系列产品。本产品选用世界著名生产厂家的原料，采用专业体外诊断试剂生产技术制造，仅供科研使用。本试剂盒用于测定大鼠血清，血浆及相关液体样本中大鼠神经酰胺(ceramide)浓度。具体适用样本请咨询。使用前请仔细阅读说明书并检查试剂组分。如有疑问，请咨询：武汉纽莱生物科技有限公司 Email:sale@newlif.com.cn 电话: 027-65563553

本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断。

实验原理

本试剂盒应用双抗体夹心法测定标本中大鼠神经酰胺(ceramide)水平。用纯化的大鼠神经酰胺(ceramide)抗体包被微孔板，制成固相抗体，往包被单抗的微孔中依次加入神经酰胺 (Ceramide)，再与 HRP 标记的神经酰胺(ceramide)抗体结合，形成抗体-抗原-酶标抗体复合物，经过彻底洗涤后加底物 TMB 显色。TMB 在 HRP 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神经酰胺(ceramide)呈正相关。用酶标仪在450nm 波长下测定吸光度 (OD 值)，通过标准曲线计算样品中大鼠神经酰胺(ceramide)浓度。

用途：本试剂盒用于体外定量检测大鼠 血清、血浆、或其他生物液中大鼠神经酰胺(ceramide)浓度。

基本性能：

性能	
灵敏度	0.75pg/ml
检测范围	3pg/ml-120pg/ml
特异性	可检测样本中的大鼠神经酰胺(ceramide)浓度。且与其他类似物无明显交叉反应
重复性	板内，板间变异系数均《10%

试剂盒组成及保存

中文名称	规格	开封后保存条件
ELISA 酶标板	96T: 8 孔×12 条 48T: 8 孔×6 条	2-8℃ 90天
标准品	96T: 0.5mlx1 (240pg/mL) 48T: 0.25mlx1	2-8℃ 90天
HRP标记抗体	96T: 6mlx1 48T: 3mlx1	2-8℃ 90天
样品稀释液	96T: 6mlx1 48T: 3mlx1	2-8℃ 180天
标准品稀释液	96T: 1.5mlx1 48T: 1mlx1	2-8℃ 180天
显色剂A	96T: 6mlx1 48T: 3mlx1	2-8℃(避光) 180天
显色剂B	96T: 6mlx1 48T: 3mlx1	2-8℃(避光) 180天
终止液	96T: 6mlx1 48T: 3mlx1	2-8℃ 180天 180天
30倍浓缩洗涤液	96T: 20mlx1 48T: 10mlx1	2-8℃ 180天 180天
说明书	1份	
封板膜	2张	
密封袋	1个	

说明：未拆封的试剂盒可以在2-8℃ 保存六个月

试剂盒所需自备物品

1. 酶标仪(450nm波长滤光片)
2. 高精度移液器，EP管及一次性吸头：0.5-10μL, 2-20μL, 20-200μL, 200-1000μL
3. 37℃恒温箱
4. 双蒸水或去离子水
5. 吸水纸
6. 加样槽

样品收集方法（具体处理方法请咨询）

- 1. 血清：**用无菌管收集，室温血液自然凝固10-20分钟，2-8℃条件离心20分钟左右（2000-3000转/分）仔细收集上清，保存过程中如出现沉淀，应再次离心。
- 2. 血浆：**应根据标本的要求选择EDTA、肝素钠或柠檬酸钠作为抗凝剂，混合10-20分钟后，2-8℃条件离心20分钟左右（2000-3000转/分），仔细收集上清，保存过程中如有沉淀形成应该再次离心。
- 3. 尿液：**用无菌管收集，2-8℃条件离心20分钟左右（2000-3000转/分）。仔细收集上清，保存过程中如有沉淀形成，应再次离心。
- 4. 组织匀浆：**用预冷的PBS (0.01M, pH=7.4)冲洗组织，去除残留血液，称重后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，在冰上充分研磨。为了进一步裂解组织细胞，可以对匀浆液进行反复冻融或超声破碎。最后将匀浆液于2-8℃，5000×g离心5-10分钟取上清检测。
- 5. 细胞提取液：**贴壁细胞用冷的PBS轻轻清洗，然后用胰蛋白酶消化，1000×g离心5分钟后收集细胞。悬浮细胞可直接离心收集。收集的细胞用冷的PBS洗涤3次。每10⁶个细胞中加入150-200 μL PBS重悬(推荐在PBS中加入蛋白酶抑制剂；若含量很低可减少PBS的体积)并通过反复冻融或超声使细胞破碎。将提取液于2-8℃，1500×g离心10分钟，取上清检测。
- 6. 细胞培养上清或其他生物体液：**收集液体后于2-8℃，1000×g离心20分钟，除去杂质及细胞碎片，取上清检测。

试剂盒注意事项

1. 试剂盒从冷藏环境中取出应在室温平衡15-30分钟后方可使用，酶标包被板开封后如未用完，板条应装入密封袋中保存。
2. 浓洗涤液可能会有结晶析出，稀释时可在水浴中加温助溶，洗涤时不影响结果。
3. 各步加样均应使用加样器，并经常校对其准确性，以避免试验误差。一次加样时间最好控制在5分钟内，如标本数量多，推荐使用排枪加样。
4. 请每次测定的同时做标准曲线，最好做复孔。如标本中待测物质含量过高（样本OD值大于标准品孔第一孔的OD值），请先用样品稀释液稀释一定倍数（n倍）后再测定，计算时请最后乘以总稀释倍数（n×5）
5. 封板膜只限一次性使用，以避免交叉污染。
6. 底物请避光保存。
7. 严格按照说明书的操作进行，试验结果判定必须以酶标仪读数为准。
8. 所有样品，洗涤液和各种废弃物都应按传染物处理。
9. 本试剂不同批号组分不得混用。

样本收集注意事项

- 1.不能检测含NaN₃的样品，因NaN₃抑制辣根过氧化物酶的（HRP）活性。
- 2.标本采集后尽快进行实验，若不能马上进行试验，可将标本放于-20℃保存，但应避免反复冻融。
- 3.我们罗列的是通用的样本处理方法，无法涵盖各种样本，对于一些特殊样本，建议实验人员多参考已发表的文献，自行设计合理的样本处理方法。

检测前准备工作

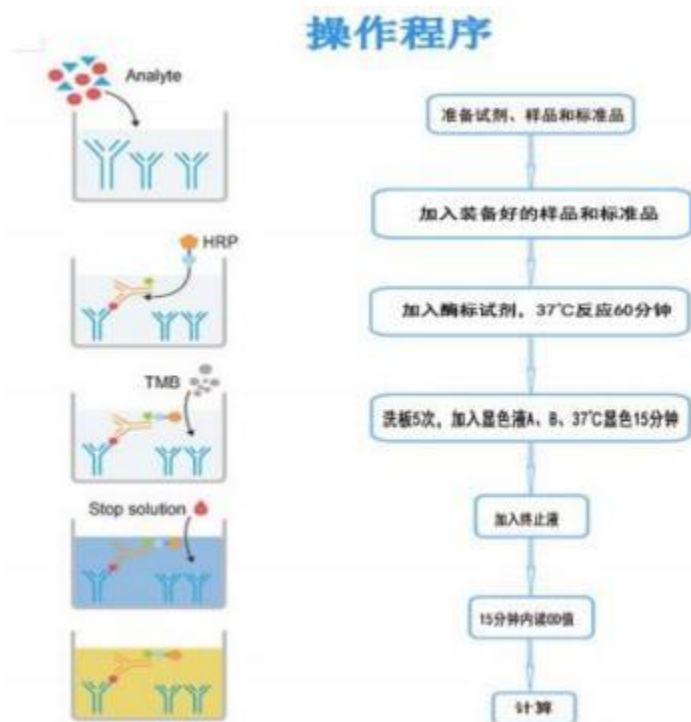
- 1.请提前20分钟从冰箱中取出试剂盒，以平衡至室温。
- 2.用双蒸水将30×浓缩洗涤液稀释成1×工作液。未用完的放回4℃。
- 3.标准品的稀释：本试剂盒提供原倍标准品一支，用户可按照下列图表在小试管中进行稀释。

120pg/mL	5号标准品	150μl 的原倍标准品加入 150μl 标准品稀释液
60pg/mL	4号标准品	150μl 的 5 号标准品加入 150μl 标准品稀释液
30pg/mL	3号标准品	150μl 的 4 号标准品加入 150μl 标准品稀释液
15pg/mL	2号标准品	150μl 的 3 号标准品加入 150μl 标准品稀释液
7.5pg/mL	1号标准品	150μl 的 2 号标准品加入 150μl 标准品稀释液

操作步骤

- 1.加样：分别设空白孔（空白对照孔不加样品及酶标试剂，其余各步操作相同）、标准孔、待测样品孔。在酶标包被板上标准品准确加样 50 μ l，待测样品孔中先加样品稀释液 40 μ l，然后再加待测样品 10 μ l（样品最终稀释度为 5 倍）。加样将样品加于酶标板孔底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀。
- 2.温育：用封板膜封板后置 37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟。
- 3.洗涤：小心揭掉封板膜，弃去液体，甩干，每孔加满洗涤液，静置 30 秒后弃去，如此重复 5 次，拍干。
- 4.加酶：每孔加入酶标试剂 50 μ l，空白孔除外。
- 5.温育：操作同 2
- 6.洗涤：操作同 3
- 7.显色：每孔先加入显色剂 A 50 μ l，再加入显色剂 B 50 μ l，轻轻震荡混匀，37 $^{\circ}$ C 避光显色 10 分钟。
- 8.终止：每孔加终止液 50 μ l，终止反应（此时蓝色立转黄色）。
- 9.测定：以空白孔调零，450nm 波长依序测量各孔的吸光度（OD 值）。测定应在加终止液后 15 分钟以内进行。

操作一览表



结果判断:

- 1.每个标准品和标本的OD 值应减去空白孔的OD 值。
- 2.以标准品的浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，利用计算机软件采用直线回归的拟合方法创建标准曲线方程，通过样本的吸光度（OD值），利用方程计算样品的浓度值。
- 3.若样本的OD值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测，计算浓度时应乘以稀释倍数。

典型数据

由于实验操作条件的不同（如操作者、移液技术、洗板技术和稳定条件等），标准曲线的OD值会有所差异。
详情请看质检报告.