

产品说明书

产品编号: NBE-236883

版本号: RN6.0



产品名称	NebuEasy™ 乙酰胆碱(ACh)ELISA试剂盒
产品规格	96T
检测范围	1.56 - 50 ng/mL (最低检测浓度0.1 ng/mL)
储存条件	4℃保存, 有效期见标签
产品应用	NebuEasy™ 乙酰胆碱(ACh)ELISA试剂盒 (产品编号: NBE-236883) 可用于测定动物血清、血浆、体液、组织匀浆及细胞培养上清中 乙酰胆碱(ACh)的含量。
检测原理	本试剂盒采用竞争法酶联免疫吸附试验 (ELISA) 。往预先包被乙酰胆碱(ACh)抗体的包被微孔中, 依次加入标本、标准品、HRP标记的竞争抗原, 经过温育并彻底洗涤。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乙酰胆碱(ACh)呈负相关。用酶标仪在450nm 波长下测定吸光度 (OD 值) , 计算样品浓度。
试剂盒组分	◇ 20×浓缩洗涤液 (25ml×1瓶) ◇ 酶标包被板 (12孔×8条) ◇ 样品稀释液 (6ml×1瓶) ◇ 竞争抗原-HRP (10mL) ◇ 底物A (6ml×1瓶) ◇ 底物B (6ml×1瓶) ◇ 终止液 (6ml×1瓶) ◇ 标准品标准品 (S0-S5) 浓度依次为: 0、1.25、2.5、5、10、20 ng/mL (0.3ml×6瓶) ◇ 封板膜 (2张) ◇ 密封袋 (1个)

20×洗涤缓冲液的稀释: 蒸馏水按 1: 20 稀释, 即 1 份的 20×洗涤缓冲液加 19 份的蒸馏水。

[操作步骤]

产品说明书

产品编号: NBE-236883

版本号: RN6.0



- (1) 从室温平衡20min后的铝箔袋中取出所需板条, 剩余板条用自封袋密封放回4℃。
- (2) 设置标准品孔和样本孔, 标准品孔各加不同浓度的标准品50μL;
- (3) 样本孔先加待测样本25μL, 再加样本稀释液25μL; 空白孔不加。
- (4) 除空白孔外, 标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的竞争抗原50μL, 用封板膜封住反应孔, 37℃水浴锅或恒温箱温育60min。
- (5) 弃去液体, 吸水纸上拍干, 每孔加满洗涤液, 静置1min, 甩去洗涤液, 吸水纸上拍干, 如此重复洗板5次 (也可用洗板机洗板)。
- (6) 每孔加入底物A、B各50μL, 37℃避光孵育15min。
- (7) 每孔加入终止液50μL, 15min内, 在450nm波长处测定各孔的OD值。

[结果计算]

- (1) 15分钟内在波长450nm的酶标仪上读取各孔的OD值;
- (2) 百分结合率计算: 设S0管计数为B0, 各标准管或样品管计数为B, 非特异管计数为NSB, 则百分结合率计算公式如下: $B/B_0 = (B - NSB)/(B_0 - NSB) \times 100\%$
- (3) logit计算: 各标准点或样品管的logit值计算公式如下: $\text{logit} = \ln(B/B_0)/(1 - B/B_0)$
- (4) 将标准品的OD均值与标准品0点的OD均相除, 为标准点的百分结合率, 在log-logit坐标纸上绘图。
- (5) Log-logit双对数标准曲线: 坐标纸上横轴从左至右第一个1-9表示为第一个10进位, 第二个1-9表示为第二个10进位。第三个1-9表示为第三个10进位。坐标纸纵轴为百分比 (1-99), 即各标准吸光值的百分结合率。取一条通过各点的直线。要求尽可能多的点在线上, 同时剩余的点均匀分布在直线的两边。样品也同样由吸光值计算百分结合率, 再从纵轴上的相应结合率找到直线上的点, 此点对应的横坐标浓度即为样品的浓度, 无须换算。
- (6) 人工处理: 以标准浓度取log值为横坐标, 对应的logit值为纵坐标在普通坐标纸上或以标准浓度为横坐标, 对应的B/B0为纵坐标在logit-log坐标纸上画出标准曲线 (理想化时是一条直线)。根据待测样品的B/B0可以从坐标纸上查出样品的浓度值。如果使用普通坐标纸, 查出的数值应取反对数才是最后的浓度值。
- (7) 自动处理: 使用logit-log或四参数数据处理模式, 由电脑自动计算得出结果。

[注意事项]

1. 试剂盒保存在 2-8℃, 使用前室温平衡 20 分钟。从冰箱取出的浓缩洗涤液会有结晶, 这属于正常现象, 水浴加热使结晶完全溶解后再使用。
2. 实验中不用的板条应立即放回自封袋中, 密封 (低温干燥) 保存。
3. 浓度为 0 的 S0 号标准品即可视为阴性对照或者空白; 按照说明书操作时样本已经稀释 5 倍, 最终结果乘以 5 才是样本实际浓度。
4. 严格按照说明书中标明的时间、加液量及顺序进行温育操作。
5. 所有液体组分使用前充分摇匀。