



## Human Neurotrophin-3 ELISA Kit

### 人神经营养因子-3 ELISA 试剂盒

产品编号: EK0472

规格: 96T

检测范围: 15.6pg/ml→1000pg/ml。

敏感性: <1pg/ml

特异性: 系统和 Neurotrophin-4 交叉反应<1%; 和其它细胞因子无交叉反应。

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: 用于体外定量分析人血清、细胞裂解液、细胞培养上清。

#### 工作原理

Neurotrophin-3, NT-3,是神经生长因子家族的成员。人和大鼠、小鼠、猪的序列完全相同。NT-3在神经细胞群的发育和维持方面有重要作用。可以促进感觉神经元和交感神经元的分化。NT-3由119个氨基酸链构成二聚体,分子量27KDa。NT-3结合p75 NGFR,并启动凋亡。激活信号传导通过TrkC受体来完成。

博士德所提供的人 Neurotrophin-3 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)。预先包被的抗体和检测相抗体都是多克隆抗体。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Neurotrophin-3呈正相关。

#### 试剂盒中内容(96孔)

内容	规格	数量
预包被抗人 NT-3 抗体的 96 孔板	96T	1 板
重组人 NT-3 冻干标准品	10ng/管	2 管
生物素标记抗人 NT-3(100X)	100ul	1 管
亲和素-过氧化物酶复合物(ABC)(100X)	100ul	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**



## 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 小时或 2-8℃过夜，离心 1000×g 10 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 10-100ng/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 1-10ng/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 15.6 -1000pg/ml。按 1: 2 稀释。100ul 样品稀释液加 100ul 样品。

特低——指待测因子≤15.6pg/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. Neurotrophin-3 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 1000pg/ml 标准品：取 100ul 10,000pg/ml 的标准品加入有 0.9ml 样品稀释液的 Eppendorf 管中，混匀，做上标记。
3. 配制 500pg/ml→15.6pg/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 500pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 62.5pg/ml, 31.3pg/ml, 15.6pg/ml。取 0.3ml 1000pg/ml 的标准品加入标记 500pg/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. 生物素标记抗人 Neurotrophin-3 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 生物素标记抗人 Neurotrophin-3 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 × 2。其余重包装好放入冰箱中。
2. 将 1000pg/ml, 500pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 62.5pg/ml, 31.3pg/ml, 15.6pg/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。对于人血清、细胞裂解液、细胞培养上清，直接加已用样品稀释液稀释的样品 100ul。
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人 Neurotrophin-3 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 依次加入已在 37℃平衡 30 分钟的 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	15.6pg/ml	31.3pg/ml	62.5pg/ml	125pg/ml	250pg/ml	500pg/ml	1000pg/ml
O.D.	0.052	0.135	0.144	0.200	0.357	0.774	1.077	2.234

### 参考文献

1. Kurihara H, Shinohara H, Yoshino H, Takeda K, Shiba H. Neurotrophins in cultured cells from periodontal tissues.J Periodontol. 2003 Jan;74(1):76-84.
2. Wang X, Butowt R, Von Bartheld CS. Presynaptic neurotrophin-3 increases the number of tectal synapses, vesicle density, and number of docked vesicles in chick embryos.J Comp Neurol. 2003 Mar 24;458(1):62-77.
3. Ganchrow D, Ganchrow JR, Verdin-Alcazar M, Whitehead MC. Brain-derived neurotrophic factor-, neurotrophin-3-, and tyrosine kinase receptor-like immunoreactivity in lingual taste bud fields of mature hamster after sensory denervation.J Comp Neurol. 2003 Jan 1;455(1):25-39.