

(仅供科研使用，不得用于临床诊断!)

褪黑素(MT)定量检测试剂盒 (ELISA)

使用说明书

规格: 48T/96T

货号: YPJ1690

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。

UpingBio technology Co.,Ltd

网址: www.upingbio.com

官方热线: 400-999-8863

监督电话: 13297213222

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。

标准曲线线性：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：本试剂盒识别天然和重组褪黑素(MT)，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：62.5 pg/mL-1000 pg/mL。

用途：用于检测血清、血浆、细胞培养上清液等样本中褪黑素(MT)的浓度。

实验原理

试剂盒采用酶联免疫分析方法。采用生物素标记褪黑素(MT)，纯化的抗褪黑素(MT)抗体包被微孔板，在竞争抑制反应中，一定量的固相抗体与生物素标记褪黑素(MT)及非标记抗原（校准品或标本）进行抑制竞争反应，抗体与生物素标记的褪黑素(MT)结合量受非标记抗原量所抑制，非标记抗原量多,抗体与生物素标记的褪黑素(MT)结合就少，反之结合就多；反应平衡后，形成固相抗体-生物素化褪黑素(MT)，再加入酶标记的亲合素，形成固相抗体-生物素化褪黑素(MT)-酶标-亲合素复合物。经加底物显色后,用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度(OD 值)。随着褪黑素(MT)浓度的升高，OD 值逐渐下降呈良好的线性关系。本试剂盒具有灵敏度高、特异性强、重复性好、操作简单、快速等特点，对样本中褪黑素(MT)的减少或升高有可靠的检出性能。

UpingBio technology Co.,Ltd

网址: www.upingbio.com

官方热线: 400-999-8863

监督电话: 13297213222

试剂盒组分与保存

未开封的试剂盒保存在 2-8 度，不得使用过期试剂盒。

| 组分 | 数量 | 主要成分 |
|----------|-------------|----------------------|
| 校准品 | 0.5ml/管*6 管 | 抗原配制的 6 个浓度标准品 |
| 包被微孔板 | 96T/48T | 预包被固相抗体 |
| HRP 标记抗体 | 6mL | HRP 标记的检测抗体 |
| 生物素化抗原 | 6mL | 检测抗原 |
| 样本稀释液 | 6mL | 磷酸盐缓冲液 |
| 底物液 A | 6mL | 过氧化氢工作液 |
| 底物液 B | 6mL | TMB 工作液 |
| 终止液 | 6mL | 酸性溶液 |
| 20×浓缩洗涤液 | 30mL | 含 0.15%Tween20 的 PBS |
| 说明书 | 1 份 | -- |
| 自封袋 | 1 个 | -- |
| 不干胶 | 2 片 | -- |

校准品浓度依次为：1000、500、250、125、62.5、0 pg/mL。

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：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。
- 3：酶标板单次未使用完，要谨记密封放到 2-8℃保存。

UpingBio technology Co.,Ltd

网址：www.upingbio.com

官方热线：400-999-8863

监督电话：13297213222

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

仅供科研使用, 不得用于临床诊断。

在试剂盒标示的有效期内使用, 过期产品不得使用。

跟其他厂家的试剂盒或者组分不能混用。

使用试剂盒配套的样品稀释液。

如果样本值高于最高标准品浓度值, 请将样本适当稀释后, 再重新测定。

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, 请排出该因素。

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, 请按国家生物试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℃。使用后立即冷藏保存试剂。

UpingBio technology Co.,Ltd

网址: www.upingbio.com

官方热线: 400-999-8863

监督电话: 13297213222

-
- 4)洗板不正确可以导致不准确的结果。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 $450\pm 10\text{nm}$ 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。

UpingBio technology Co.,Ltd

网址: www.upingbio.com

官方热线: 400-999-8863

监督电话: 13297213222

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—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

使用前，所有的组分都要至少复温 120min，确保充分复温到室温。

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。

底物：底物液 A 和 B，在使用前，按 1:1 体积充分混合，混合后 15 分钟内使用。

操作程序

UpingBio technology Co.,Ltd

网址：www.upingbio.com

官方热线：400-999-8863

监督电话：13297213222

-
- 1.将各种试剂移至室温平衡半小时，取浓缩洗涤液，根据当批检测数量，用蒸馏水 1：20 稀释，混匀后备用。
 - 2.将预包被板从密封袋中取出，设一个空白对照孔，不加任何液体；每个校准品设 2 孔，每孔加入对应校准品 50 μ l；其余每个检测孔直接加待测血清或质控品 50 μ l。
 - 3.除空白孔外所有孔加入生物素化抗原 50 μ l，混匀，贴上封板膜，置 37 $^{\circ}$ C 温育 60 分钟。
 - 4.手工洗板：弃去孔内液体，洗涤液注满各孔，静置 10 秒甩干，重复 3 次后拍干。洗板机洗板：选择洗涤 3 次程序洗板后拍干。
 - 5.每孔加入酶标亲合素 50 μ l（空白对照孔除外），混匀，贴上封板膜，置 37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟。
 - 6.手工洗板：弃去孔内液体，洗涤液注满各孔，静置 10 秒甩干，重复 3 次后拍干。洗板机洗板：选择洗涤 3 次程序洗板后拍干。
 - 7.每孔加显色剂 A 50 μ l，显色剂 B 50 μ l，振荡混匀后，置 37 $^{\circ}$ C 避光显色 15 分钟，每孔加终止液 50 μ l。
 - 8.用酶标仪读数，取波长 450nm，先用空白对照孔调零点，然后测定各孔光密度值（OD 值）。

UpingBio technology Co.,Ltd

网址：www.upingbio.com

官方热线：400-999-8863

监督电话：13297213222

结果计算

9、以标准品浓度做为横坐标，对应的吸光度（OD 值）作为纵坐标，利用计算机软件，采用四参数 Logistic 曲线拟合（4-pl），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。【用 ELISA Calc 软件计算】

10、如果样品被稀释，通过上述方法测的的浓度值，要乘以稀释倍数，才是样品的最终浓度。



(示意图，仅供参考)

UpingBio technology Co.,Ltd

[问题分析]

若实验效果不好，请及时对显色结果拍照，保存实验数据，保留所用板条及未使用试剂，然后联系我公司技术支持为您解决问题。同时您也可以参考以下资料：

[问题解答]

| 问题描述 | 可能原因 | 相应对策相应对策 |
|---------|--------------------|---|
| 标准曲线梯度差 | 吸液或加液不准 | 检查移液器及吸头 |
| | 平衡时间太短 | 保证充足的平衡时间 |
| | 洗涤不完全 | 保证洗涤时间和洗涤次数及每孔的加液量 |
| 显色很弱或无色 | 孵育时间太短 | 保证充足的孵育时间 |
| | 实验温度不正确 | 使用推荐的实验温度 |
| | 试剂体积不够或漏加 稀释不正确 | 检查吸液及加液过程，保证所有试剂按顺序足量添加 |
| | 酶标记物失活或底物失效 | 混合酶结合物和底物，通过迅速显色来检查判断 |
| 读数数值低 | 酶标仪设置不正确 | 在酶标仪上检查波长及滤光片设置 |
| | | 提前打开酶标仪预热 |
| 变异系数大 | 加液不正确 | 检查加液情况 |
| 背景值高 | 检测抗体的工作浓度过高 | 使用推荐的稀释倍数 |
| | 酶标板洗涤不完全 | 保证每步清洗完全；如果用自动洗板机，请检查所有的出口是否有堵塞；是否使用试剂盒配备的洗涤液 |
| | 洗液有污染 | 配制新鲜的洗液 |
| 灵敏度低 | ELISA 试剂盒保存不当 | 按说明书要求保存相关试剂 |
| | 读数前未终止 | OD 读数前应在每孔中加入终止液 |

UpingBio technology Co.,Ltd