仅供科研使用，不得用于临床诊断

植物神经酰胺（Ceramide）定量检测试剂盒（ELISA）

定量检测血清、血浆、细胞培养上清液、组织中植物神经酰胺（Ceramide）的含量。

使用试剂盒前，必须仔细阅读本说明书。

实验原理

试剂盒采用酶联免疫分析方法。采用生物素标记神经酰胺（Ceramide），纯化的抗神经酰胺（Ceramide）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神经酰胺（Ceramide）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神经酰胺（Ceramide）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神经酰胺（Ceramide）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Syndecan-4，再加入酶标记的亲和素，形成固相抗体-生物素化神经酰胺（Ceramide）-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）。随着神经酰胺（Ceramide）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，对血清中神经酰胺（Ceramide）的减少或升高有可靠的检出性能。

试剂盒限制性

1、仅供科研使用，不得用于临床诊断。

2、在试剂盒标示的有效期内使用，过期产品不得使用。

3、跟其他厂家的试剂盒或者组分不能混用。

4、样品需要稀释的话可以用 PBS（PH7.4)稀释。

5、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。

6、待测样本中可能存在的异嗜抗体会干扰检测结果，检测前，请排出该因素。

7、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。

技术提示

1、混合蛋白溶液时，避免起泡。

2、加校准品与样本时，每个校准品浓度和样本都要更换移液枪头，公共组分应该悬臂加样，避免交叉污染。

3、合适的温育时间，和充分的洗涤步骤，是保证实验结果准确性的必要条件。

4、使用自动洗板机时，加入一个 30 秒浸泡的步骤，可以提高检测精度。

5、底物溶液为无色液体，保存过程中变为蓝色，代表底物溶液已经失效，不得使用。

6、终止液加样顺序与底物溶液加样顺序一致，加入终止液后，蓝色底物产物，会瞬间变为黄色。

7、实验中，用剩的板条，应立即放回自封袋中，密封（低温干燥）保存。

8、所有液体组分，使用前充分摇匀，严格按照说明书标明的时间、加样量及加样顺序进行温

育操作。

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
底物液 A	6mL	过氧化脲工作液
底物液 B	6mL	TMB 工作液
终止液	6mL	2mol/L 稀释液
样本稀释液	6mL	PBS
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、0pg/ml。

本品必须按照具有潜在的感染性进行处理，处理过程应当遵循通用的安全措施。

其他用品

1、酶标仪（450nm）

2、精密移液器及一次性吸头

3、蒸馏水

4、洗瓶或者自动洗板机

5、37℃水浴锅或恒温箱

6、500ml 量筒

生物安全

1、检测必须符合实验室管理规范的规定，严格防止交叉污染，所有样品、洗弃液和各种废弃物都应按照传染物进行处置。

2、试剂盒的液体组分中，含有 proclin-300 防腐剂，可能引起皮肤过敏反应，避免吸入烟雾与皮肤接触。

3、底物液对皮肤、眼睛和上呼吸道有刺激作用，避免吸入烟雾。

4、戴上防护手套，实验完成后彻底洗手。

样品的采集和储存

样本类型和采集

以下只是列出样品采集的一般指南。所有样本采集过程中，不得使用叠氮钠做为防腐剂。

1、细胞培养上清：4000rpm 条件下离心 20min，去除细胞颗粒和聚合物，上清液保存在-20℃以下，避免反复冻融。

2、血清：使用不含热原和内毒素的试管，操作过程中避免任何细胞刺激，4000rpm 条件下离心 20min，小心地分离出血清，保存在- 20℃以下，避免反复冻融。

3、血浆：肝素，EDTA，或柠檬酸钠作为抗凝剂。在 4000rpm 条件下，离心 20 分钟取上清，血浆保存在-20℃以下，避免反复冻融。

4、组织：用预冷的 PBS (0.01 M,pH=7.4)冲洗组织，去除残留血液，称重后将组织剪碎。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 1g 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，可以对匀浆液进行超声破碎或反复冻融。最后将匀浆液 5000×g 离心 5-10 分钟，取上清检测。

样本保存和稳定性

样本在 2-8℃条件下，可以储存 72h，或者在- 20℃储存 6 个月。样本收集后，不是一次检测完，请按一次用量分装冻存，避免反复冻融，使用时在室温下解冻，确保样品均匀充分解冻。

检验方法

操作程序

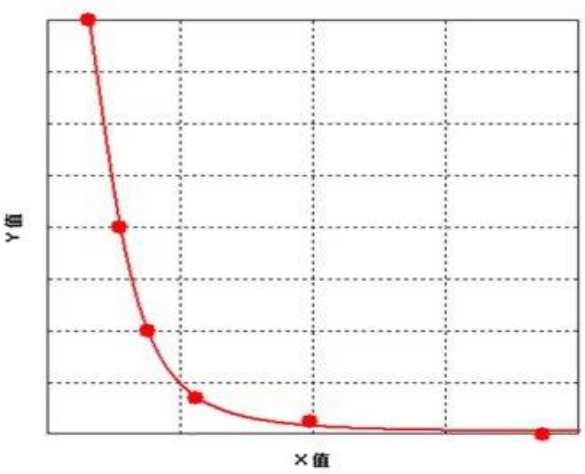
1. 将各种试剂移至室温平衡两小时，取浓缩洗涤液，根据当批检测数量，用蒸馏水 1：20 稀释，混匀后备用。
2. 将预包被板从密封袋中取出，设一个空白对照孔，不加任何液体；每个校准品设 2 孔，每孔加入对应校准品 50μl；其余每个检测孔直接加待测血清或质控品 50μl。
3. 除空白孔外所有孔加入生物素化抗原 50μl，混匀，贴上封板膜，置 37℃温育 60 分钟。
4. 手工洗板：弃去孔内液体，洗涤液注满各孔，静置 10 秒甩干，重复 3 次后拍干。洗板机洗板：选择洗涤 3 次程序洗板后拍干。
5. 每孔加入酶标亲合素 50μl（空白对照孔除外），混匀，贴上封板膜，置 37℃温育 30 分钟。
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 50μl，显色剂 B 50μl，振荡混匀后，置 37℃避光显色 15 分钟，每孔加终止液 50μl。

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）。

结果计算

检测完成后，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。

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）

试剂盒性能指标

1、物理性能

外观和物理检查：液体组分应澄清，无沉淀或絮状物；所有组分应无包装破损。各组分装量不少于组分表中要求。

2、剂量反应曲线线性

用四参数 Logistic 曲线拟合（4-pl），剂量-反应曲线相关系数（r）的绝对值应不低于 0.9900。

3、精密度

批内精密度：三组已知的高、中、低浓度样品，进行二十次在同一个板块内精度评估。批内变异系数 CV%小于 15%。

批间精密度：三组已知的高、中、低浓度样品，进行二十次在不同板块内精度评估。批间变异系数 CV%小于 15%。

4、灵敏度

最低检出限：应不高于 7.8125pg/ml。

5、回收率

三组已知的高、中、低浓度样品，进行五次在同一个板块内回收率评估，回收率在 85%-115%之间。

6、稳定性

2℃-8℃保存，有效期 6 个月。

7、检测范围

62.5 pg/ml - 1000 pg/ml。