

人GFAP双抗夹心ELISA检测试剂盒

请在实验前仔细阅读本说明书

产品货号: KE00210
规格: 96T
灵敏度: 10.4 pg/mL
检测范围: 31.25 - 2000 pg/mL
用途: 此试剂盒用于定量检测血清、血浆中人GFAP浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

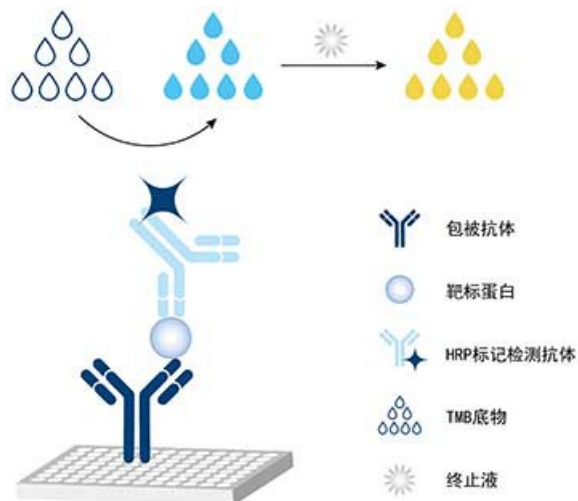
目录

一：背景信息	3
二：检测原理	3
三：需自备的实验器材	3
四：试剂盒组分及储存	4
五：实验注意事项	4
六：样本准备	4
七：试剂准备	5
八：实验步骤	6
九：实验参数	7
9.1 参考标曲图	7
9.2 精密度	7
9.3 加标回收率	7
9.4 样本值	8
9.5 灵敏度	8
9.6 线性	8
十：参考文献	8

一：背景信息

GFAP（胶质纤维酸性蛋白）是一种中间丝蛋白，在星形胶质细胞谱系中特异性表达，广泛用于标记大脑中的星形胶质细胞。GFAP在脑损伤和多发性硬化症等神经疾病的患者血清和血浆中水平升高，具有一定诊断意义。

二：检测原理



◀双抗夹心模式图 (检测抗体直标HRP)

按操作顺序形成抗体夹心结构后，加入TMB底物，板孔液体由无色变成蓝色，再加入终止液液体变为黄色后进行吸光度值测定。

三：需自备的实验器材

- 3.1 酶标仪 (可读取450 nm和630 nm双波长);
- 3.2 高精度移液器及一次性移液器枪头;
- 3.3 洗板机 (亦可手动洗板);
- 3.4 EP管 (用于稀释标准品及样本);
- 3.5 吸水毛巾或滤纸 (用于拍干);
- 3.6 烧杯和量筒;
- 3.7 用于ELISA实验的数据分析的统计拟合软件 (推荐四参数拟合方法)，如：Origin，ELISA Calc等。

四：试剂盒组分及储存

英文名称	中文名称	规格	数量
Microplate	预包被酶标板 - 96孔板	8孔 × 12条	1 块
Protein standard	标准品 - 冻干粉状 *	4000 pg/瓶	2 瓶
Detection antibody, HRP-conjugated (100×)	HRP标记检测抗体浓缩液 (100×) **	120 µL/支	1 支
Sample Diluent PT 4-ec	样本稀释液 PT 4-ec	30 mL/瓶	1 瓶
Detection Diluent	抗体稀释液	30 mL/瓶	1 瓶
Wash Buffer Concentrate (20×)	浓缩洗涤液 (20×)	30 mL/瓶	1 瓶
Tetramethylbenzidine Substrate (TMB)	显色底物 TMB	12 mL/瓶	1 瓶
Stop Solution	终止液	12 mL/瓶	1 瓶
Plate Cover Seals	封板膜		4 张
储存条件： 1：未开启试剂盒可在2-8℃条件下存放6个月或者在-20℃条件下存放1年 2：已开启试剂盒可在2-8℃存放7天 3：每次实验均使用新的标准品,使用后丢弃			

* 使用对应的样本稀释液对标准品进行复溶，复溶过程避免产生气泡

** 开盖前请离心

五：实验注意事项

- 5.1 避免皮肤接触终止液以及TMB 显色液；
- 5.2 在实验过程中，注意穿戴个人防护装备，如实验服，手套，口罩和护目镜；
- 5.3 请勿将不同批次的试剂进行混用，过期产品请勿使用；
- 5.4 在使用自动洗板机时，板孔加入洗涤液之后，设置30秒的浸泡程序，以提高分析的精确度。

六：样本准备

- 6.1 血清：全血标本室温凝固 30 min后1000×g 离心15 min，取上清立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融。
- 6.2 血浆：可用EDTA、肝素或柠檬酸盐作为抗凝剂，标本采集后1000×g 离心15 min，立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融
(注意：标本溶血会影响检测结果，因此溶血标本不宜进行检测)。

七：试剂准备

7.1 洗涤液（1×）：

如果洗涤液（20×）有晶体析出，37℃加热至晶体全部溶解。按1:20稀释倍数进行稀释：如取30 mL 浓缩洗涤液（20×），加入570 mL 超纯水或去离子水，得到洗涤液（1×）。

7.2 HRP标记检测抗体（1×）：

开盖前瞬时离心，按1:100比例进行稀释，稀释前根据预先计算实验所需的总量配制（100 μL/孔），实际配制时应多配制0.1-0.2 mL。如10 μL HRP标记检测抗体浓缩液（100×）加 990μL 抗体稀释液进行配制，轻轻混匀。

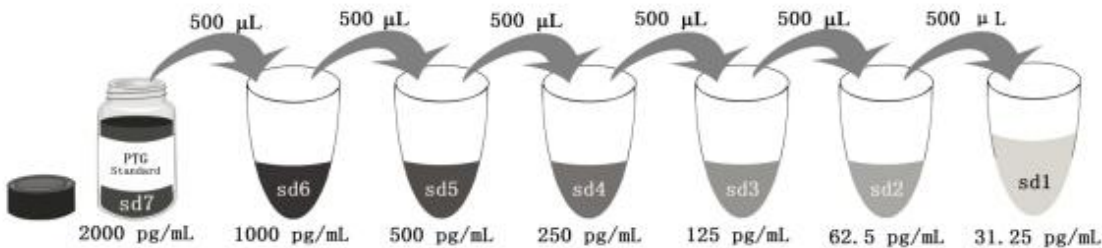
7.3 待检测样本：

不同的样本使用相应的样本稀释液进行稀释，如果样本检测值超过标曲最高范围，可将样本进行一定的稀释后再进行实验，使样本的检测值处于标曲范围内，不同样本的稀释倍数需自行优化。

稀释比推荐如下：人血清、血浆1:2稀释，样品采集、处理和储存的差异可能导致测值的改变。

7.4 梯度稀释的标准品：

使用2 mL PT 4-ec样本稀释液复溶标准品，具体操作如下：



Add # μL of Standard diluted in the previous step	—	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL
# μL of Sample Diluent PT 4-ec	2000 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL
	"sd7"	"sd6"	"sd5"	"sd4"	"sd3"	"sd2"	"sd1"

八：实验步骤

实验前,需要将所需试剂在室温平衡20-30 min (HRP标记 检测抗体浓缩液不需要平衡室温,即用即取) ; 在进行标准品、样本以及不同试剂加样时, 更换枪头, 避免接触微孔板的内表面, 不同的试剂, 使用不同的加样槽;

8.1 根据实验用量, 取出需要用到的酶标板条, 剩余板条加入干燥剂放入铝箔袋密封后存放于4°C, 并于一周之内用完;

8.2 加样, 分别设零孔、标准孔、待测样本孔。零孔加样本稀释液100 μ L, 余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本100 μ L/孔, 注意不要产生气泡 (建议标准品和样本都做复孔, 尽量避免实验误差, 确保上样不间断, 5-10 min完成加样) ;

8.3 酶标板盖上覆膜, 室温500 rpm转速下震荡孵育2 h;

8.4 洗涤

1) 揭开封板膜 (动作轻柔, 避免动作过大导致液体溢出串孔) , 弃液体, 拍干;

2) 洗涤液 (1 $\times$) 洗涤板条, 每孔350-400 μ L, 洗涤后, 甩掉液体拍干板条, 重复此步骤4次, 避免异物进入板孔以及板条干燥;

8.5 每孔加100 μ L HRP标记检测抗体 (1 $\times$) (参照试剂准备部分7.2), 盖上封板膜, 室温500 rpm转速下震荡孵育40 min;

8.6 重复步骤8.4;

8.7 显色: 每孔加TMB显色液100 μ L, 室温500 rpm转速下震荡孵育 15-20 min (如果颜色偏浅, 可适当延长显色时间, 不超过30 min; 保持显色底物始终处于避光状态, 显色底物在加样前应是无色透明, 如有变色, 请勿使用) ;

8.8 终止: 每孔加终止液100 μ L, 蓝色变黄色。终止液与TMB显色液的加样顺序一致; (注意: 眼睛和皮肤避免接触终止液)

8.9 读数: 以630 nm为校正波长, 用酶标仪在450 nm波长测量各孔的光密度(OD值)。加入终止液后5 min内进行读数, 若无630 nm波长, 也可直接使用450 nm 波长读数;

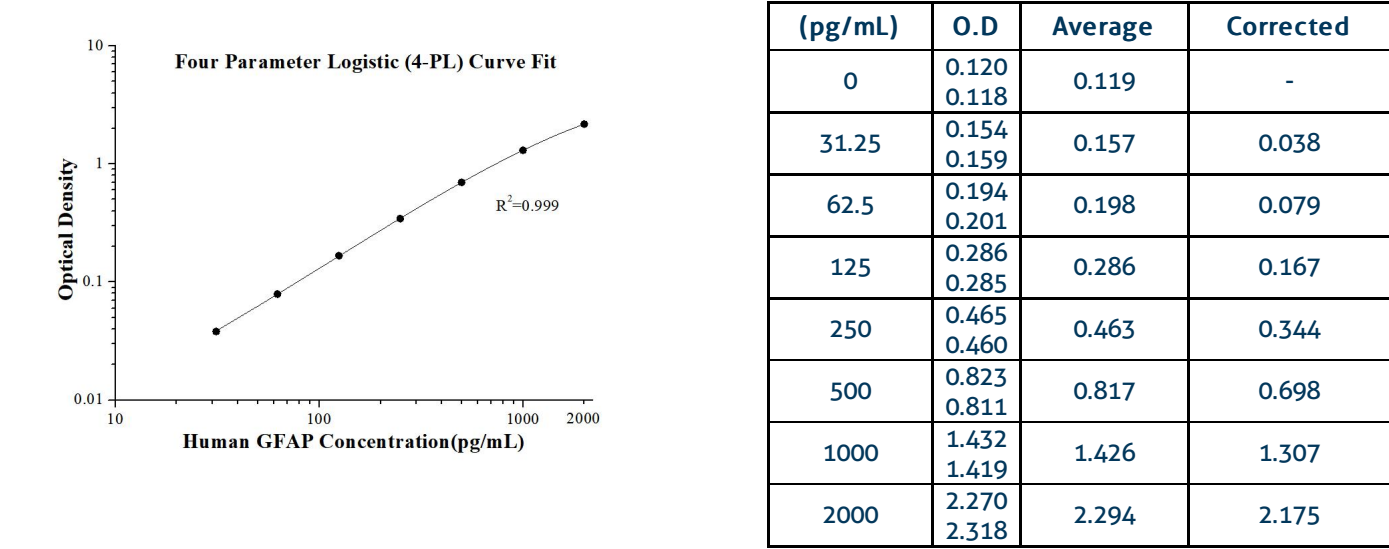
8.10 数据分析: 每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值, 设置复孔, 取其平均值。以标准品的浓度为横坐标, OD 值为纵坐标, 使用专业软件 (如Origin、ELISACalc等) 进行四参数拟合 (4-PL) , 根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度, 乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

操作流程如下:

步骤	试剂	体积	孵育时间	洗涤次数	孵育温度
1	标准品或样本	100 μ L	120 分钟	4 次	覆膜后室温500 rpm 震荡孵育
2	HRP标记检测抗体 (1 $\times$)	100 μ L	40 分钟	4 次	覆膜后室温500 rpm 震荡孵育
3	显色 TMB	100 μ L	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后室温500 rpm 震荡孵育, 避光
4	终止液	100 μ L	0 分钟	不需要洗涤	-
5	加入终止液后以630 nm为校正波长, 在450 nm处测量OD值, 此过程建议不超过5分钟				

九：实验参数

9.1 参考标曲图



9.2 精密度

板内精密度：3个不同浓度的样本在板内重复测定 20次；
板间精密度：3个不同浓度的样本在板间重复测定 24次。

板内精密度 (CV内)					板间精密度 (CV 间)				
样本	数量	平均值 (pg/mL)	标准差	变异系数CV%	样本	数量	平均值 (pg/mL)	标准差	变异系数CV%
1	20	899.6	17.4	1.9	1	24	945.7	22.8	2.4
2	20	217.8	13.4	6.1	2	24	227.1	12.0	5.3
3	20	110.8	8.6	7.8	3	24	114.7	7.7	6.7

9.3 加标回收率

样本稀释后，在标曲范围内选择高、中、低3个浓度，进行人GFAP的加标回收率实验，结果如下：

样本类型	稀释倍数	均值 (%)	范围 (%)
人血浆	1:4	88	77-107
	1:8	95	85-105

9.4 样本值

应用本试剂盒，检测来自人血清、血浆中人GFAP的浓度：

样本类型	均值 (pg/mL)	检出率 (%)	范围 (pg/mL)
人血清 (n=17)	124.4	76	ND-344.6
人血浆 (n=5)	135.4	60	ND-194.1

9.5 灵敏度

用20个重复的零孔平均OD值加上两倍标准差得到的OD值带入标准曲线拟合出对应的浓度值，此试剂盒中人GFAP的灵敏度为10.4 pg/mL。

9.6 线性

用对应样本稀释液稀释样本，使稀释后的检测值处于标曲范围内，线性数据如下：

稀释倍数		人血清	人血浆
1:2	均值(%)	100	100
	范围(%)	-	-
1:4	均值(%)	113	108
	范围(%)	112-114	106-110
1:8	均值(%)	113	122
	范围(%)	110-116	113-128
1:16	均值(%)	108	97
	范围(%)	107-109	93-109

十：参考文献

1. A Abdelhak. et al. (2018) Sci Rep. 2018 Oct 4;8(1):14798. (PMID: 30287870)
2. Alberto Benussi. et al. (2020) J Alzheimers Dis. 2020;77(3):1129-1141. (PMID: 32804092)