

人神经胶质纤维酸性蛋白（H-GFAP）ELISA 定量检测试剂盒

1、试剂盒简介

此人神经胶质纤维酸性蛋白（H-GFAP）定量检测试剂盒，采用抗H-GFAP的单克隆配对抗体分别作为包被抗体和检测抗体，组成双抗体夹心ELISA检测模型，样品孔OD值大小和样品中GFAP的含量呈正相关。本试剂盒检测下限为1ng/mL

2、试剂盒组分

序号	名称	规格	存储条件	产品货号
1	抗H-GFAP抗体预包被的96孔酶标板	1块（96T）	2-8℃	TD-BK3402
2	H-GFAP标准品： 32 ng/mL、16 ng/mL、8 ng/mL、 4ng/mL、2 ng/mL、1 ng/mL、 0 ng/mL	各1支（0.4mL/瓶）	-20℃或-80℃	TD-BK3403
3	H-GFAP内部参比：20 ng/mL	1支（0.4mL/瓶）	-20℃或-80℃	TD-BK3404
4	酶标记检测抗体	1支（130μL/瓶）	-20℃或-80℃	TD-BK3405
5	样品稀释液	1瓶（30mL/瓶）	2-8℃	TD-BK3406
6	酶标抗体稀释液	1瓶（30mL/瓶）	2-8℃	TD-BK3407
7	10X洗涤液	1瓶（30mL/瓶）	2-8℃	TD-BK0004
8	TMB底物显色液	1瓶（13mL/瓶）	2-8℃	TD-BK0007
9	终止液	1瓶（8mL/瓶）	2-8℃	TD-BK0008
10	试剂盒使用说明书	1份		

3、保存条件

本试剂盒各组分按标签温度保存，有效期3个月。

4、其它仪器

酶标仪（波长 450 nm、参比波长603nm），10 μL、100 μL、1 mL 移液器，300 μL 多道移液器，移液器吸头、37℃恒温水浴箱。

5、样品处理

- 5.1 血清：室温血液自然凝固10-20分钟，4500转/分钟、离心15分钟左右，收集上清。
- 5.2 血浆：根据样本的要求选择 EDTA或柠檬酸钠作为抗凝剂，混合10-20分钟后，4500转/分钟、离心15分钟左右。收集上清。
- 5.3 脑脊液、胸腹水、尿液：用无菌管收集，4500转/分钟、离心15分钟左右。收集上清，保存过程中 如有沉淀形成，应再次离心。
- 5.4 培养基上清：用无菌管收集。4500转/分钟、离心15分钟左右，收集上清。
- 5.5 组织标本：切割标本后，称取重量。加入一定量的 PBS，用液氮迅速冷冻保存备用。标本融化后2-8℃加入一定量的 PBS，手动或匀浆器将标本匀浆充分。4500转/分钟、离心15分钟左右，收集上清。分装后备用。

5.6 标本采集后尽早进行提取，提取按相关文献进行，提取后应尽快进行实验。若不能马上进行试验，可将标本放于-80℃保存，避免反复冻融。

5.7 因NaN₃抑制HRP的活性，故不能检测含NaN₃的样品。

6、操作步骤

6.1 将浓缩洗涤液用蒸馏水做 10 倍稀释（如有结晶析出，需37℃溶解后再稀释）配置成工作洗涤液。

6.2 取出酶标板在室温放置、回温。标准品各浓度做平行两孔，50 μL/孔加入酶标板中。加待检样品、内部参比（建议做平行孔），50 μL/孔。然后将酶标记抗H-GFAP抗体用酶标抗体稀释液做 1:100 稀释（酶标记抗体用多少稀释多少，现用现配）加入各反应孔、100 μL/孔，此时各孔内液体总体积为 150 μL。加样过程须在 15 min 内完成。

6.3 置37℃避光反应 1 h，孵育完成后弃反应液，用工作洗涤液洗涤四遍，拍干。

6.4 用移液器加 TMB 底物显色液（使用前恢复至室温）100 μL/孔，37℃避光反应 15 min，请勿震荡。

6.5 用移液器加终止液 50 μL/孔，轻微震荡混匀。

6.6 在酶标仪 450 nm 波长处读数（603nm作为参比波长）。

7、结果判定

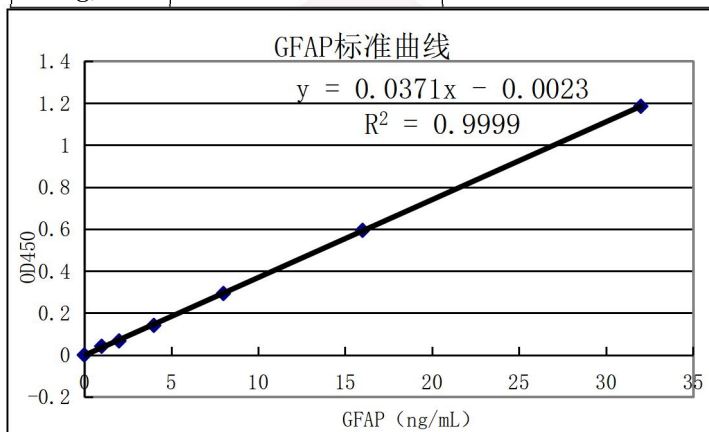
7.1 实验结果需满足以下参数：

0ng/mL OD值<0.1；32ng/mL OD值>1.0；拟合曲线 $R^2 \geq 0.98$ 。

检测限：零浓度标准品加上两倍的标准差（20 个零孔计算值），本试剂盒检测限计算为 0.21 ng/mL。定量限为标准曲线检测下限1 ng/mL。

7.2 在EXCEL里面以标准浓度为横坐标，消零 OD 值为纵坐标作散点图，添加趋势线，再显示曲线方程和 R^2 值，将检测样品 OD 值消零处理后带入直线方程计算对应的浓度。

标准浓度	OD1	OD2	平均值	消零OD
32ng/mL	1.21	1.225	1.2175	1.1850
16ng/mL	0.633	0.62	0.6265	0.5940
8ng/mL	0.332	0.319	0.3255	0.2930
4ng/mL	0.17	0.177	0.1735	0.1410
2ng/mL	0.107	0.092	0.0995	0.0670
1ng/mL	0.082	0.066	0.0740	0.0415
0ng/mL	0.032	0.033	0.0325	0.0000



注：标准曲线不能通用，每次实验必须重新绘制。

7.3 判定:

在标准曲线中, 设GFAP浓度 0-16 ng/mL 为区间A; GFAP浓度16-32 ng/mL 为区间 B; GFAP浓度大于32 ng/mL 为区间C。

7.3.1 如测得的 OD 值小于标准曲线中 2 ng/mL对应OD值, 则GFAP含量测定结果计为小于2 ng/mL。

7.3.2 如不同稀释浓度的样本测得的 OD 值均位于区间 A, 则最终结果计算取其最低稀释度的测定值。

7.3.3 如不同稀释度的测定值均位于区间 B 或同时位于区间 A 和 B 或同时位于区间 B和 C, 则取其最接近OD 16 ng/mL 的测定值。

7.3.4 如不同稀释度测定值均位于区间 C, 则需将样本做进一步稀释测定, 使其测定值居 2 – 32 ng/mL 所对应的 OD 值区间, 计算方法按上述 7.3.2 – 4。

7.3.5 如高稀释度测得 OD 高于低稀释度或未稀释的样本 OD, 则可能是操作失误或样本中 GFAP含量过高 (HOOK 效应), 需重试或调整稀释度。

7.3.6 最终结果要考虑稀释因素 (实际含量=计算值×稀释倍数)。

8、注意事项

8.1 如样品中含量高于32 ng/mL, 可将样品做适当稀释 (建议先做预实验或查看相关文献)。

8.2 样品如为冻干制剂, 应用样品稀释液充分溶解混匀。

8.3 反应时应将酶标板放入洁净的密闭空间中, 为防止反应孔中落入异物。

8.4 洗涤拍干后, 应消除各孔内残余的气泡。

8.5 开封后, 将未使用的板条放回加入干燥剂的密封铝箔袋中, 置 4°C密闭保存。

8.6 浓缩洗涤液从4°C拿出来可能会有结晶, 需要复溶后再进行稀释。