

Human FGF basic ELISA Kit

使用前请仔细阅读说明书

目录号: NE106

保存: 2~8℃避光保存1年





品质高于一切
精品服务客户



目录

1.	产品说明.....	1
2.	产品适用性.....	1
3.	试剂盒组成.....	2
4.	自备材料设备.....	2
5.	样本收集.....	2
6.	样本稀释.....	3
7.	工作液配制.....	3
8.	操作步骤.....	4
9.	酶标板孔加样示意图.....	5
10.	结果分析.....	5
11.	参考数据.....	6
12.	精密度.....	6
13.	回收率.....	6
14.	线性.....	7
15.	校准.....	7
16.	灵敏度.....	7
17.	样本值.....	7
18.	特异性.....	7
19.	注意事项.....	8



产品说明

碱性成纤维细胞生长因子(FGF basic), 也称bFGF、FGF2或FGF- β , 是成纤维细胞生长因子家族中的一员。FGF basic是一种作用广泛的生长因子, 能刺激成纤维细胞、成骨细胞, 神经元细胞、内皮细胞、角质形成细胞、软骨细胞等多种类型细胞的生长。bFGF不仅能刺激新生血管形成, 参与创伤愈合和组织重组, 促进胚胎组织发育和分化等, 还与肿瘤的发生发展密切相关。

本试剂盒采用双抗体夹心ELISA法定量测定人血清、血浆和细胞培养上清中的FGF basic含量。本试剂盒采用高亲和力的抗人FGF basic抗体预包被酶标板, 将标准品/待测样本加入微板孔中, 经过孵育后样本中存在的FGF basic会与酶标板上的预包被抗体特异性结合。洗涤去除未结合物后, 将生物素标记的抗人FGF basic检测抗体加入微板孔中, 再次孵育后检测抗体会与锚定在酶标板上的FGF basic特异性结合。随后, 将辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(Streptavidin-HRP)加至微孔板中并孵育, 通过检测抗体上的生物素和链霉亲和素发生的高强度非共价结合, 形成“包被抗体-人FGF basic蛋白-检测抗体-Streptavidin-HRP”免疫复合物。再次洗涤后, 将显色底物TMB加至微板孔中, HRP会催化TMB底物生成蓝色产物, 颜色反应的深浅将与样本中FGF basic的浓度成正相关。而后加入终止液终止反应, 在450 nm波长(参考波长570 - 630 nm)处测定吸光度值。通过绘制标准曲线, 由样本吸光度值可计算出样本中所含FGF basic浓度。本试剂盒特异性强、检测灵敏度高, 同时操作更加便捷。



双抗体夹心ELISA原理示意图

产品适用性

细胞培养上清、血清、血浆等。



试剂盒组成

Component	NE106-01	Storage
人FGF basic抗体预包被酶标板	96 T	2~8℃
人FGF basic标准品	2瓶	2~8℃
标准品&样本稀释液	15ml/瓶	2~8℃
100×人FGF basic检测抗体	120 μl/支	2~8℃
100×Streptavidin-HRP	120 μl/支	2~8℃ (避光)
检测抗体&Streptavidin-HRP稀释液	25ml/瓶	2~8℃
20×洗液	50 ml/瓶	2~8℃
TMB显色底物	12 ml/瓶	2~8℃ (避光)
终止液	6 ml/瓶	2~8℃
封板膜	4张	

注意：试剂盒在开封的条件下，2~8℃可储存1个月；未开封试剂盒请在有效期1年内使用。

自备材料设备

1. 酶标仪：主波长450 nm，参考波长620 nm；
2. 去离子水；
3. EP管、移液器、吸头、量筒等；
4. 微孔板震荡器；
5. 自动洗板机或8道手动洗瓶或多道移液器。

样本收集

1. 细胞培养上清：收取细胞培养上清，300×g，4℃离心10分钟，将上清等量分装于EP管中并保存于-20℃，避免反复冻融（24小时内检测可于2~8℃保存）。
2. 血清样本：血液室温自然凝固30分钟后，1000×g，4℃离心10分钟，然后将上清等量分装于EP管中并保存于-20℃，避免反复冻融（24小时内检测可于2~8℃保存）。
3. 血浆样本：抗凝剂推荐使用EDTA或柠檬酸钠。将全血收集到含抗凝剂的采血管中，混匀后室温放置至少20分钟，1000×g，4℃离心10分钟，然后将上清等量分装于EP管中并保存于-20℃，避免反复冻融（24小时内检测可于2~8℃保存）。



注意：溶血、高血脂的血清、血浆样本可能会影响检测结果的准确度，应尽量避免使用。

样本稀释

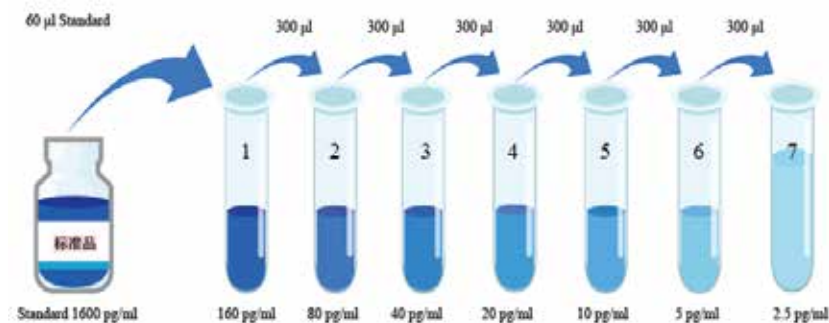
1. 血清/血浆样本需要用标准品&样本稀释液2倍稀释后进行检测，例如：
100 μ l血清+100 μ l 标准品&样本稀释液。
2. 若细胞培养上清样本阳性值在曲线范围内，不用稀释液稀释，可用原液直接检测；若阳性值超出曲线范围，需要用标准品&样本稀释液稀释到曲线范围内进行检测，计算浓度时应乘以相应稀释倍数。
3. 建议正式实验前做预实验以确定稀释倍数。

工作液配制

配制前请将所有试剂恢复至室温。20 $\times$ 洗液若出现结晶，放37 $^{\circ}$ C温浴至结晶全部溶解。

- 1) **1 $\times$ 人 FGF basic 检测抗体**：使用前点甩离心，使管壁上的液体集中在管底。按当次实验所需用量，用检测抗体&Streptavidin-HRP稀释液将100 $\times$ 人FGF basic检测抗体稀释至1 $\times$ 工作浓度。配制完成后需在15分钟内使用。
- 2) **1 $\times$ Streptavidin-HRP**：使用前点甩离心，使管壁上的液体集中在管底。按当次实验所需用量，用检测抗体&Streptavidin-HRP稀释液将100 $\times$ Streptavidin-HRP稀释至1 $\times$ 工作浓度。配制完成后需在15分钟内使用。
- 3) **1 $\times$ 洗液**：按当次实验所需用量，用去离子水将20 $\times$ 洗液稀释至1 $\times$ 工作浓度。配制完成后可在2~8 $^{\circ}$ C保存30天。
- 4) **人 FGF basic 标准品溶解**：根据标准品标签上标注的溶解体积，用相应体积的标准品&样本稀释液对冻干标准品进行溶解，复溶后标准品的浓度为1600 pg/ml，复溶后的标准品请在30分钟内使用。
- 5) **标准品梯度稀释**：用标准品&样本稀释液将复溶后的标准品稀释10倍，即取复溶后的标准品60 μ l，加入到540 μ l标准品&样本稀释液中，充分混匀，记为1号管，此时1号管的浓度为160 pg/ml；然后按照下图进行2倍梯度稀释，在2-7号管中分别加入300 μ l标准品&样本稀释液；取300 μ l 1号管液体加入至2号管，此时2号管的浓度为80 pg/ml，混匀后取300 μ l加入至3号管，此时3号管的浓度为40 pg/ml，以此类推梯度稀释至7号管（2.5 pg/ml）。160 pg/ml作为标准曲线的最高点，标准品&样本稀释液作为标准曲线的零点（0 pg/ml），即空白值。



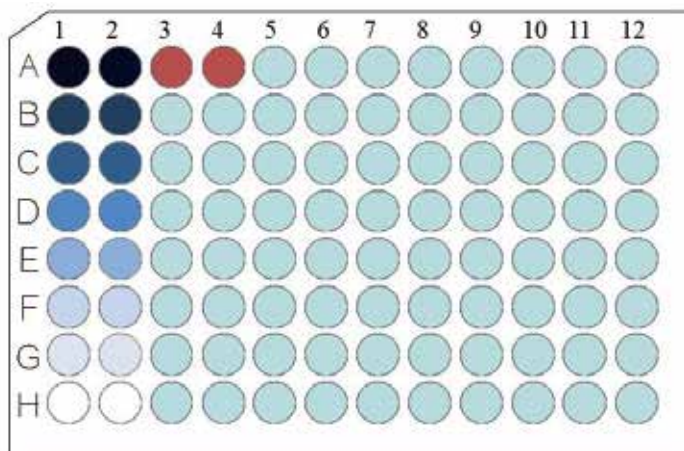


操作步骤

1. 检测前请将所有试剂恢复至室温。取出当次实验所需板条，未用的板条请及时放入铝箔袋中封口，2~8℃保存。
2. 将稀释好的标准品及样本分别加入到对应的板孔中，100 µl/孔，在微孔板震荡器上震荡30秒混匀，盖好封板膜后室温孵育2小时；标准品和样本建议做复孔检测，且加入试剂的顺序应保持一致，使各复孔测试结果一致。
3. 弃掉孔内液体，用1×洗液洗板，300 µl/孔，每次洗板时建议在微孔板震荡器上震荡30秒后，弃掉孔内洗液。重复操作5次，末次在吸水纸上拍干。
4. 在所有板孔中加入1×检测抗体，100 µl/孔，在微孔板震荡器上震荡30秒混匀，盖好封板膜后室温孵育1小时。
5. 重复步骤3。
6. 在所有板孔中加入1×Streptavidin-HRP，100 µl/孔，在微孔板震荡器上震荡30秒混匀，盖好封板膜后室温孵育30分钟。
7. 重复步骤3。
8. 在所有板孔中加入TMB显色底物，100 µl/孔，在微孔板震荡器上震荡30秒混匀，盖好封板膜后室温孵育20分钟。
9. 孵育完成后加入终止液，50 µl/孔，在主波长450 nm，参考波长620 nm的波长下进行读数。
10. 实验完毕后将未用完的试剂及酶标板外框放回试剂盒并于2~8℃储存，建议1个月内用完。



酶标板孔加样示意图



注：A1/A2：100 μ l 160 pg/ml标准品

B1/B2：100 μ l 80 pg/ml标准品

C1/C2：100 μ l 40 pg/ml标准品

D1/D2：100 μ l 20 pg/ml标准品

E1/E2：100 μ l 10 pg/ml标准品

F1/F2：100 μ l 5 pg/ml标准品

G1/G2：100 μ l 2.5 pg/ml标准品

H1/H2：100 μ l 0 pg/ml标准品（即标准品&样本稀释液）

A3/A4：100 μ l 样本

结果分析

- 1.用酶标仪进行双波长检测，测定主波长450 nm和参考波长620 nm的OD值。OD值为450 nm的OD测定值减去620 nm的OD测定值。
- 2.计算标准品复孔的平均OD值，然后减去空白值（0 pg/ml标准品的平均OD值），得到标准品的校正值。以标准品的浓度为横坐标，OD校正值为纵坐标，用直线回归或四参数法生成标准曲线。

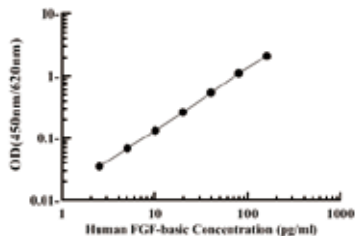


3. 通过样本OD值和标准曲线方程计算样本浓度。若样本OD值高于标准曲线上限，应进行适当稀释后重测，计算浓度时应乘以相应稀释倍数。

参考数据

每次检测均需建立标准曲线，以下数据仅作为示例参考。

标准品 pg/ml	OD值		平均值	校正值
160	2.175	2.119	2.147	2.119
80	1.146	1.145	1.1455	1.1175
40	0.58	0.56	0.57	0.542
20	0.307	0.276	0.2915	0.2635
10	0.171	0.152	0.1615	0.1335
5	0.093	0.101	0.097	0.069
2.5	0.076	0.089	0.063	0.035
0	0.024	0.032	0.028	0



标准品复孔结果数据解读：上表中0 pg/ml标准品两个复孔的平均OD值为 $(0.032+0.024)/2=0.028$ ，校正值定为0。160 pg/ml标准品两个复孔的平均OD值为 $(2.175+2.119)/2=2.147$ ，则其校正值为 $2.147-0.028=2.119$ 。

精密度

板内精密度

用3个已知浓度的样本在一块酶标板上测定20个重复孔，以此评估板内的精密度。

板间精密度

用3个已知浓度的样本在不同酶标板上测定20个重复孔，以此评估板间的精密度。

	板内			板间		
	1	2	3	1	2	3
平均值(pg/ml)	59.4	28.2	12.8	58.9	28.0	13.2
标准差	1.9	0.6	0.4	2.8	1.1	0.7
变异系数 (%)	3.2	2.1	3.1	4.7	3.9	5.3

回收率

在4份健康人的血清、血浆及细胞培养上清中加入不同浓度的人FGF basic，未加入 FGF basic的样本作为本底，计算回收率。



样本类型	平均回收率 (%)	范围 (%)
血清	105	88~115
EDTA血浆	91	80~105
柠檬酸钠血浆	112	102~120
细胞上清	99	93~106

线性

在4份健康人的血清、血浆中加入高浓度的人 FGF basic，进行线性稀释，以此检测线性回收率。

稀释比例	回收率 (%)	血清	EDTA血浆	柠檬酸钠血浆
1:2	平均值 (%)	88.7	83	106
	范围 (%)	85~92	80~86	98~120
1:4	平均值 (%)	103	101	110
	范围 (%)	100~106	96~108	104~120
1:8	平均值 (%)	112	113	114
	范围 (%)	108~116	102~120	103~120

校准

本试剂盒的标准品为TransGen Biotech校准过的高纯度的重组人FGF basic。

灵敏度

人FGF basic的最低可检测浓度为1.5 pg/ml。灵敏度是根据20个重复的零标准品OD值的平均值加两倍标准差计算得到的相对应浓度。

样本值

使用本试剂盒检测了30份健康人血清样本中FGF basic的水平，最高浓度为13 pg/ml，平均浓度为6.5 pg/ml。

特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人FGF basic。利用重组人的TNF- α 、GM-CSF、IL-2、IL-12 p70、IL-6、IL-10、EGF、IFN- γ 等细胞因子进行特异性的评估，没有观察到交叉反应和干扰影响。



注意事项

1. 本试剂盒应2~8℃避光保存，开封后1个月内用完。
2. 为保证结果准确，每次检测均需做标准曲线。
3. 实验中所用试剂均需充分混匀。
4. 每次洗板完成后，均需在吸水纸上拍干，若板孔内有气泡，可用吸头戳破，注意每个孔只能用一个吸头，避免交叉污染。
5. TMB显色底物为无色透明液体，如有变色请勿使用。
6. TMB显色后可根据显色的深浅来判断是否需要提前或延后加入终止液。
7. 加完终止液后，请在30分钟内完成读数。
8. 推荐使用主波长450 nm，参考波长620 nm的波长下进行读数，若只使用单波长450 nm读数，OD值可能整体偏高，空白值也会相应增高，导致试剂盒的准确度降低。
9. 试剂盒中的终止液具有腐蚀性，操作人员在使用时需戴上手套并注意防护，如果不慎接触，请用大量清水冲洗并及时就医。
10. 为避免交叉污染，加样时请注意每个样品和标准品必须更换枪头。请在实验中使用一次性试管、枪头、封板膜及洁净塑料容器。
11. 不同批号或不同来源的试剂盒组分不可混用。



本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V1.0-202207

服务投诉电话 +86-10-57815020

服务投诉邮箱 complaints@transgen.com.cn

