

人神经胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) ELISA 检测试剂盒

使
用
说
明
书

货号：nrbe001

检测范围:15.6-1000pg/ml

规格：96T/48T

保存温度：2-8℃

种属反应：人

有效期：6个月

本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断

目录

(一) 胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 简介:	3
(二) 实验原理:	3
(三) 注意事项:	3
(四) 试剂盒组成:	4
(五) 样本处理及要求:	4
(六) 实验所需自备实验器材:	6
(七) 检测前准备工作:	6
(八) 操作步骤:	7
(九) 实验结果计算:	7
(十) 试剂盒性能:	9

纳睿博恩生物

(一) 人神经胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 简介:

GFAP 是胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein) 的英文简称, 是星形胶质细胞活化的标志物。胶质纤维酸性蛋白。神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP)是一种III型中间丝状蛋白, 以单体形式存在。

该基因编码成熟星形胶质细胞的一种主要中间丝蛋白。在发育过程中, 它被用作区分星形胶质细胞和其他胶质细胞的标记。这种基因的突变会导致亚历山大病, 这是一种中枢神经系统星形胶质细胞的罕见疾病。选择性剪接导致多个转录变异编码不同的异构体。2023年, 伦敦大学学院团队发现了阿尔茨海默病新标记物 GFAP。

(二) 实验原理:

本试剂盒采用双抗夹心法酶联免疫吸附实验 (Elisa)。往包被有人胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 捕获抗体的酶标板中, 依次加入待检样品、标准品、HRP 标记的检测抗体, 然后经过温育和洗涤, TMB 显色, 并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的人胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度 (OD 值), 计算样品浓度。

灵敏度: 6.28pg/ml

特异性: 可检测样本中人的 GFAP, 与其类似物无明显的交叉反应。

(三) 注意事项:

1. 严格按照规定的时间和温度进行孵育。所有试剂都必须在使用前达到室温 20-25℃。使用后放回 4℃ 保存。
2. 在加入底物前确保尽量吸干孔内液体。整个过程中不要让酶标板干燥时间过长。
3. 酶标仪读数时清洁掉板底残留的液体和手指印, 否则会影响读数。
4. 在储存和温育时避免强光直接照射。

5. 底物显色液应呈无色的颜色，已经变蓝的底物液不能使用。
6. 避免试剂和样本的交叉污染。
7. 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试剂的生物活性。
8. 不能使用过期产品，不同货号 and 批号组分不得混用。
9. 不建议使用试剂盒以外的重组蛋白。
10. 如果可能传播疾病，所有的样品都应管理好，按照规定的程序处理样品和检测装置。

(四) 试剂盒组成：

名称	96 孔配置	48 孔配置	开封后保存条件
预包被酶标板	8 孔×12	8 孔×6	-20℃
标准品	2 支	1 支	-20℃，复溶后当天使用
通用稀释液	2×20ml	1×20ml	2-8℃
浓缩酶标记检测抗体（100×）	120 μ l	60 μ l	-20℃，避光
洗涤液（20×）	2×10ml	1×10ml	2-8℃
底物（TMB）	10ml	5ml	-20℃，避光
终止液	6ml	3ml	2-8℃
封板膜	4 张	4 张	无
说明书	1 份	1 份	无

(五) 样本处理及要求：

1. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围，建议实验

前通过相关文献预估样本中待测物的浓度并通过预实验确定样本的实际浓度。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。

2. 若所检样本不在说明所列样本类型之中，建议做预实验验证其检测有效性。

3. 血清：将收集于血清分离管的全血样本在室温放置 2 小时或 2-8℃ 过夜，然后 1000×g 离心 20 分钟，取上清即可，或将上清置于 -20℃ 或 -80℃ 保存，但应避免反复冻融。

4. 血浆：用 EDTA 或肝素作为抗凝剂采集样本，并将样本在采集后的 30 分钟内于 2-8℃ 1000×g 离心 15 分钟，取上清检测，或将上清置于 -20℃ 或 -80℃ 保存，但应避免反复冻融。

5. 组织匀浆：用预冷的 PBS (0.01M, pH=7.4) 冲洗组织，去除残留血液（匀浆中裂解的红细胞会影响检测结果），称重后将组织剪碎。将剪碎的组织与对应体积的 PBS（一般按照 1: 9 的重量体积比，比如 1g 的组织样品对应 9ml 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，于冰上充分研磨或匀浆机研磨。为了进一步裂解组织细胞，可以对匀浆液进行超声破碎，或者反复冻融。最后将匀浆液于 5000×g 离心 5-10 分钟，取上清检测。

6. 细胞培养物上清：请 1000×g 离心 20 分钟，取上清即可检测，或将上清置于 -20℃ 或 -80℃ 保存，但应避免反复冻融。

7. 细胞裂解液：贴壁细胞用预冷 PBS 轻轻清洗，然后用胰蛋白酶消化，1000×g 离心 5 分钟后收集细胞；悬浮细胞可直接离心收集。收集的细胞用预冷 PBS 清洗 3 次，每 1×10^6 个细胞中加入 150-200 μ l PBS 重悬（推荐在 PBS 中加入蛋白酶抑制剂；若含量很低可适当减少 PBS 体积）并通过反复冻融或超声使细胞破碎。将提取液于 2-8℃，1500×g 离心 10 分钟，取上清检测。

8. 其他生物样本：1000×g 离心 20 分钟，取上清检测。

9. 样品外观：样品应清澈透明，悬浮物应离心除去。

10. 样品保存：样本收集后若在 1 周内进行检测可保存于 4℃，若不能即使检测，请按一次使用量分装，冻存于-20℃（一个月内检测），或-80℃（6 个月内检测），避免反复冻融，样本溶血后会影
响最后检测结果，因此溶血样本不宜进行此项检测。

(六) 实验所需自备实验器材：

1. 酶标仪（450nm）
2. 高精度移液器及吸头：0.5-10 μl、5-50 μl、20-200 μl、200-1000 μl
3. 37℃恒温箱
4. 蒸馏水或去离子水

(七) 检测前准备工作：

1. 请提前 10 分钟从冰箱中取出试剂盒，平衡至室温。

2. 标准品梯度工作液配制：加入 1ml 通用稀释液至冻干标准品中，静置 15 分钟待其完全溶解后轻轻混匀（浓度为 1000pg/ml），然后按照以下浓度：1000pg/ml、500pg/ml、250pg/ml、125pg/ml、62.5pg/ml、31.25pg/ml、15.625pg/ml、0 进行稀释。稀释方法：取 7 支 EP 管，每管加入 500 μl 通用稀释液，1000pg/ml 的标准品工作液中吸取 500 μl 到第一支 EP 管中混匀配成 1000pg/ml 的标准品工作液，按此步骤
往后依次吸取混匀。

3. HRP 标记的检测抗体工作液配制：使用前 15 分钟将浓缩生物素化抗体于 1000×g 离心 1 分钟，以通用稀释液将 100×浓缩生物素化抗体稀释成 1×工作浓度，现配现用。

4. 1×洗涤液配制：取 10ml 20×洗涤液到 190ml 蒸馏水中（从冰

箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶，属于正常现象，可放置室温，待结晶完全溶解后再配制）。

(八) 操作步骤：

1. 酶标条从冰箱取出后平衡至室温，取出实验所需，剩余用自封袋密封放回 4℃。

2. 加样：分别将样品或不同浓度标准品按照 100 μl 每孔加入相应孔中，空白孔加入 100 μl 通用稀释液。盖上封板膜后 37℃ 温育 60 分钟。（最好将待测样本用通用稀释液最低稀释 1 倍后再加入酶标板内检测，减少基质效应对测试结果的影响，最后计算样本浓度时再乘以相应的稀释倍数，建议所有的待测样本和标准品在检测中设置复孔）。

3. 温育完成后，弃去液体，不用洗涤。每孔直接加入 HRP 标记的检测抗体工作液 100 μl，盖上封板膜后 37℃ 温育 40 分钟。

4. 洗板：温育完成后，弃去液体，每孔加入 200 μl 1× 洗涤液，静置 1 分钟，弃去洗涤液，并在吸水纸上拍干，重复洗涤 5 次。也可用洗板机代替洗涤过程。

5. 底物反应：每孔加入底物（TMB）90 μl，盖上封板膜，室温孵育 15 分钟。

6. 终止：每孔加入终止液 50 μl，立即在 450nm 波长处测定各孔的 OD 值。加入终止液后时间过长会影响最终读数。

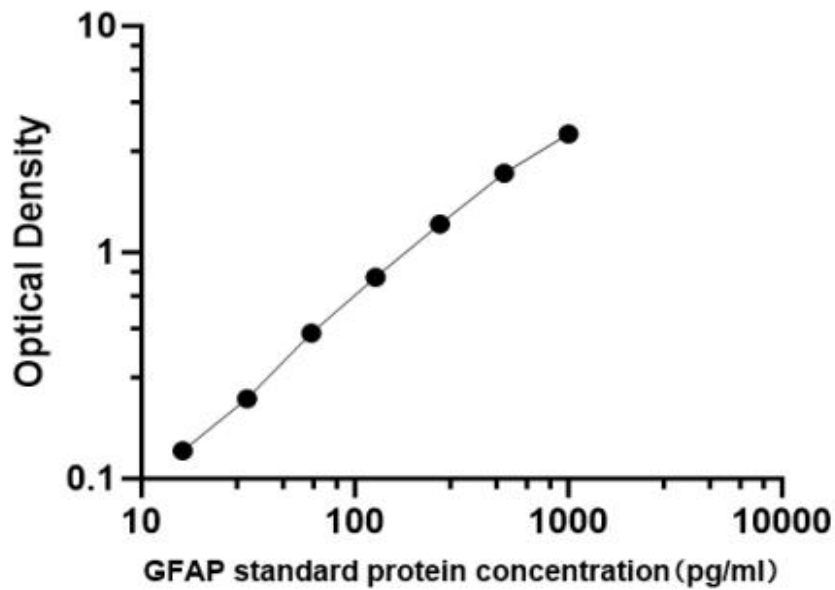
(九) 实验结果计算：

计算样品和标准品复孔的平均 OD 值减去空白孔的 OD 值作为校正值。在双对数坐标纸上，以浓度为横坐标，OD 值为纵坐标绘制标准曲线。

若样品的 OD 值高于标准曲线的上限，应适当稀释后重测。

参考曲线:

标准蛋白浓度 (pg/ml)	1	2	3	平均值	校准值
0	0.1029	0.109	0.1082	0.1067	0.0000
15.62	0.2556	0.2395	0.2249	0.2400	0.1333
31.2	0.3571	0.3274	0.3125	0.3323	0.2256
62.5	0.6111	0.5198	0.5099	0.5469	0.4402
125	0.9868	0.8447	0.8188	0.8834	0.7767
250	1.6183	1.4055	1.3077	1.4438	1.3371
500	2.6261	2.2777	2.1484	2.3507	2.2440
1000	3.5282	3.4853	3.3299	3.4478	3.3411



注意：本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线计算标本含量。

(十) 试剂盒性能：

1. 重复性：板内变异系数小于 5%，板间变异系数小于 5%
2. 回收率：在选取的健康人血清、血浆和细胞培养上清中加入 3 个不同浓度水平的人 GFAP 蛋白，计算回收率。

样本类型	范围 (%)	平均回收率
血清 (n=10)	89-102	96
血浆 (n=10)	95-101	101
细胞培养上清 (n=10)	94-106	102

纳睿博恩生物