

小鼠酸性成纤维细胞生长因子酶联免疫吸附测定试剂盒

Mouse FGF-acidic ELISA Kit

本产品冰袋运输; 保存于 4℃ (其中 **标准品** 需保存于 -20℃), 保质期 6 个月; **标准品** 如存放于 4℃, 1~2 周内有效。

货号规格

HJ165 96次

产品特点

-  **高灵敏度**——多次重复结果表明, 最小检出量为 11.6 pg/mL;
-  **高特异性**——与小鼠 FGF-basic, S100A13 均无交叉反应, 与人 FGF-acid 有 21.9% 的交叉反应性;
-  **重复性好**——板内, 板间变异系数均小于 10%。

产品简介

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法检测样品中小鼠 FGF-acidic 的浓度。小鼠 FGF-acidic 捕获抗体已经预包被于酶标板上, 当加入样品或标准品时, 其中的小鼠 FGF-acidic 会与捕获抗体结合, 而其它游离成分则会通过洗涤被除去。接着, 再加入生物素化的抗小鼠 FGF-acidic 抗体后, 抗小鼠 FGF-acidic 抗体与小鼠 FGF-acidic 接合, 形成夹心的免疫复合物, 其它游离成分则通过洗涤被除去。随后加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的亲合素, 生物素与亲合素特异性结合, 这样亲合素上标记的 HRP 就与夹心的免疫复合物连接起来, 而其它游离成分则通过洗涤被除去。最后加入显色剂, 若样品中存在小鼠 FGF-acidic, 则会形成免疫复合物, 其上连接的 HRP 会催化无色的显色剂氧化生成蓝色物质, 而后加入终止液, 最终产物呈黄色。通过酶标仪检测, 读其 450nm 处的 OD 值, 小鼠 FGF-acidic 浓度与 OD450 值之间呈正比, 通过检测标准品绘制标准曲线, 对照未知样品中 OD 值, 即可计算出样品中小鼠 FGF-acidic 浓度。

背景简介

酸性成纤维细胞生长因子(FGF-acidic), 又名肝磷酯结合生长因子(HBGF-1)或 FGF-1, 是 FGF 生长因子家族中成员之一, 具有多种生物活性。

FGF-acidic 是一种由 155 个氨基酸构成的非糖基化蛋白, 形成过程中没有明显的信号肽序列。小鼠 FGF-acidic 与 FGF-basic 的氨基酸序列同源性为 52%, 与小鼠其它 FGF 家族蛋白的氨基酸序列同源性为 15%~35%, 小鼠 FGF-acidic 与牛、人、猪和大鼠序列分别有 91%、96%、94%和 100%的同源性, 并表现出明显的种间交叉反应性。

FGF-acidic 在脑中含量很高, 另外肝实质细胞、血管平滑肌细胞、中枢神经的神经元细胞、骨骼肌细胞、成纤维细胞、角化细胞、内皮细胞、肠柱状上皮细胞、垂体嗜碱性粒细胞和垂体嗜酸性粒细胞等都有分泌。

FGF-acidic 在细胞生长、迁移和分化中发挥着重要作用, 其主要刺激中胚层来源的细胞分化, 也能刺激来源于神经外胚层、内胚层和外胚层的许多种类的细胞的生长和分化。

产品内容

组分	体积或数量
小鼠FGF-acidic预包被板	12条
样品分析缓冲液	5mL
标准品稀释液(5×)	10mL
小鼠FGF-acidic标准品	≥2支(冻干)
小鼠FGF-acidic生物素化抗体	10mL
HRP标记的亲合素	10mL
浓缩洗涤液(20×)	30mL
显色剂TMB	10mL
终止液	5mL
封板胶纸	3张

操作步骤

◆ 样品制备

1. 根据样品种类选择相应的处理方法：
 - A. 细胞上清：将细胞培养上清液 $100\sim 500\times g$ 离心 5 min，去除悬浮物后即可；
 - B. 血清样品：将全血在室温下静置 0.5~2h，待其自然凝固并析出血清后，离心取黄色上清即可 (4°C , $1,000\sim 2,000\times g$, 10 min)，注意请勿吸取沉淀，制备好的血清需置于冰上待用，请勿在其中添加任何防腐剂或抗凝剂；
 - C. 血浆样品：使用 EDTA 对全血进行抗凝处理后，混合均匀置于冰上，离心取黄色上清即可 (4°C , $1,000\sim 2,000\times g$, 10 min)，注意请勿吸取沉淀，制备好的血浆需置于冰上待用；

注意：① 小鼠血清或血浆样品请用 **样品分析缓冲液** 做倍比稀释后再检测；

② 若待测样品无法及时检测，样品制备完成后，请分装冻存于 -20°C ，避免反复冻融；

③ 请保证待测样品清澈透明，检测前如发现样品中有悬浮物，需通过离心去除；

④ 为了保证检测结果准确，请勿使用溶血、黄疸、高血脂或污染的样品。

◆ 检测准备工作

2. 试剂盒自冰箱取出后，请置于室温平衡 20 min；检测完成后，剩余试剂请及时置于 4°C 保存；
3. 将 **浓缩洗涤液 (20 $\times$)** 用双蒸水或去离子水稀释为 $1\times$ 洗涤液；
4. 将 **标准品稀释液 (5 $\times$)** 用双蒸水或去离子水稀释为 $1\times$ 标准品稀释液；
5. 按标准品标签上注明的复溶体积，用 $1\times$ 标准品稀释液复溶使标准品终浓度达到 800pg/mL ，室温操作，**请严格控制在 $25\sim 28^{\circ}\text{C}$** ，静置 15~20 min 后轻轻混悬，用移液器吹打数次，使其彻底溶解，然后按下表用 $1\times$ 标准品稀释液倍比梯度稀释后依次加入检测孔中。（最高浓度为 800pg/mL ，将 $1\times$ 标准品稀释液作为浓度 0pg/mL 。）

管号	稀释液用量 (μL)	复溶后标准品用量 (μL)	标准品的最终浓度 (pg/mL)
A	0	250	800
B	250	250	400
C	250	250 (从 B 管中取)	200
D	250	250 (从 C 管中取)	100
E	250	250 (从 D 管中取)	50
F	250	250 (从 E 管中取)	25
G	250	0	0

注意：标准品复溶加样后，剩余部份请丢弃。

◆ 检测流程

6. 通过计算确定一次实验所需的板条数，取出所需板条放置于框架内，多余的板条请放回铝箔袋密封，保存于 4°C ；

注意：① 标准品和样品建议做双复孔检测；

② 建议设置本底校正孔，即空白孔，只加入相应体积的 **显色剂 TMB** 和 **终止液** 即可；

③ 每次实验均需绘制标准曲线。

7. 将样品和不同浓度标准品 ($100\mu\text{L}/\text{孔}$) 分别加入相应孔中，用封板胶纸封住反应孔，室温孵育 120 min。细胞上清样品一般可直接进行检测，如超过试剂盒的检测范围，可用 $1\times$ 标准品稀释液进行相应稀释；对于血清或血浆样品，可先在孔中加入 $50\mu\text{L}$ **样品分析缓冲液**，接着加入 $50\mu\text{L}$ 样品，如超出

检测范围，可先加入 50 μ L **样品分析缓冲液**，接着加入 50 μ L 用 1 $\times$ 标准品稀释液稀释后的样品，再进行检测，请注意记录好样品的稀释倍数；

注意：① 请查阅相关文献确定样品中待检测蛋白的大致浓度，若其大于或小于本试剂盒的最高或最低标准品浓度，请将样品适当稀释或浓缩后再进行检测；

② 整个加样过程不宜超过 10min，否则可能会影响检测结果。

8. 洗板 5 次，每孔 1 $\times$ 洗涤液用量为 300 μ L，注入与吸出间隔 15~30s，洗完后将板倒扣在厚吸水纸上拍干；

注意：洗涤过程至关重要，洗涤不充分会导致结果产生较大误差。

9. 加入 **小鼠 FGF-acidic 生物素化抗体** (100 μ L/孔，无需稀释)。用封板胶纸封住反应孔，室温孵育 60 min；

注意：检测血清和血浆样品时，检测抗体的孵育时间应适当延长。

10. 洗板 5 次，方法同步骤 8；

11. 加入 **HRP 标记的亲合素** (100 μ L/孔，无需稀释)。用封板胶纸封住反应孔，避光室温孵育 20 min；

12. 洗板 5 次，方法同步骤 8；

13. 加入 **显色剂 TMB** (100 μ L/孔)，避光室温孵育 10~20 min；

注意：在保存和使用时，请勿将 TMB 接触氧化剂和金属。

14. 加入 **终止液** (50 μ L/孔)，混匀后即刻使用酶标仪测量 OD450，同时设定 540 nm 或 570 nm 作为校正波长，即可计算得到校正吸光度值 (OD450-OD540 或 OD450-OD570)；

注意：读取 OD 值建议在 10min 内完成。

◆ 数据分析

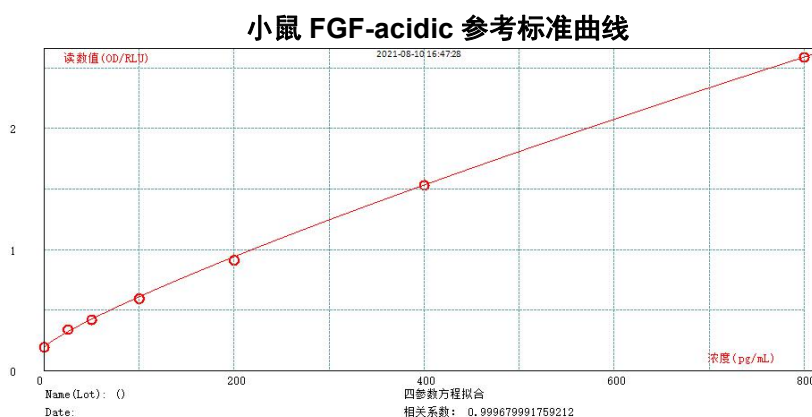
15. 绘制标准曲线。以标准品浓度作横坐标，OD 值作纵坐标，利用计算机软件作四参数逻辑 (4-PL) 曲线拟合创建标准曲线，通过样品的 OD 值即可在标准曲线上计算出其相应浓度。

注意：① 复孔 OD 值在 20% 的差异范围内结果才有效，复孔 OD 值取平均后可作为测量值；

② 每个标准品或样品的 OD 值应减去本底校正孔的 OD 值；

③ 若样品 OD 值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测，计算浓度时应乘以稀释倍数。

◆ 标准曲线范例



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样品含量。

注意事项

1. **浓缩洗涤液** 低温情况下可能会出现结晶，请水浴加热使结晶完全溶解后再配制工作液；
2. 严禁混用不同批号试剂盒的组分；
3. 加样过程请避免产生气泡，实验操作过程中一定要保证试剂充分混匀，否则会使结果产生较大误差；
4. 说明书中提到的室温条件，请严格控制在 25~28 $^{\circ}$ C；
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；
6. 本产品仅限科研使用。

版本号：21C24