

货号：**abs510025**

规格：**96T**

品名：**Human GM-CSF basic ELISA KIT**

一、背景

粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)，也称为CSF-2，是共同 β 链(βc) 细胞因子家族的多营养30 kDa 成员，也包括 IL-3 和 IL-5。GM-CSF 采用带有两个链内二硫键的 α -螺旋构型。它由多种活化的免疫间充质和上皮细胞类型分泌，并以可变糖基化单体的形式循环。在炎症过程中，它在多种细胞类型中上调，包括致脑炎性 T 细胞，过敏原暴露的肺内皮细胞和 IgE 激活的肥大细胞。成熟的人 GM-CSF 与小鼠和大鼠 GM-CSF 分别具有54%和63%的氨基酸序列同一性。GM-CSF 的高亲和力受体由 50 kDa 配体结合 α 亚基(GM-CSFR α)和 120 kDa信号转导 βc 组成。据报道，功能性GM-CSF受体的化学计量是GM-CSF，GM-CSFR α 和 βc 的 2: 2: 2 复合物。值得注意的是， βc 亚基由 IL-3 和 IL-5 的受体复合物共享，IL-5 可能通过GM-CSFR α 和 βc 发出信号。GM-CSF 还可以利用 Syndecan-2 作为共受体(14)。GM-CSF 拥有许多功能。它诱导 CD34+干细胞前体产生单核细胞，嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞。它可以与 IL-4 或 Flt-3 配体协同作用，诱导骨髓和真皮树突状细胞的发育和维持。它也起嗜中性粒细胞和树突状细胞趋化剂的作用。GM-CSF 促进 Th1 和 Th17 细胞介导的自身免疫炎症以及树突状细胞，小胶质细胞，肺泡巨噬细胞和嗜酸性粒细胞的炎症激活。此外，它与 G-CSF 协同促进肿瘤细胞的增殖和侵袭。人 GM-CSF 免疫测定是一项 3.5-4.5 小时的固相 ELISA，旨在测量细胞培养上清液，血清和血浆中人 GM-CSF 的水平。它包含大肠杆菌表达的重组人 GM-CSF 和针对重组因子的抗体。已显示可准确定量重组人 GM-CSF。使用天然人 GM-CSF 获得的结果显示线性曲线与使用试剂盒标准获得的标准曲线平行。这些结果表明该试剂盒可用于确定人 GM-CSF 的相对质量值。

二、概述

1. 检测原理

本试剂盒采用双抗体夹心酶联免疫吸附检测技术。特异性抗人GM-CSF 抗体预包被在高亲和力的酶标板上。酶标板孔中加入标准品、待测样本和生物素化的检测抗体，经过孵育，样本中存在的GM-CSF与固相抗体和检测抗体结合，形成免疫复合物。洗涤去除未结合的物质后，加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(Streptavidin-HRP)。洗涤后，加入显色底物，避光显色。加入终止液终止反应，在 450 nm 波长(参考校正波长 540nm 或 570nm) 测定吸光度值。

2. 检测局限

- 仅供科研使用，不可用于体外诊断；
- 请在试剂盒有效期内使用；
- 不同试剂盒及不同批号试剂盒的组分不能混用；
- 样本值若大于标准曲线的最高值，应将样本用稀释剂（1×）稀释后重新检测；若细胞培养上清液样本需分布稀释，除最后一步用稀释剂稀释外，其它中间稀释可采用细胞培养基；
- 检测结果的不同可由多种因素引起，包括实验人员的操作、移液器的使用方式、洗板技术、反应时间或温度、试剂盒的储存等。

三、试剂盒组成及所需器材

1. 试剂盒组成及储存

未开封试剂盒，2-8℃储存；请在试剂盒有效期内使用

组成	描述	规格	拆封后，稀释或重溶的试剂有效期
Human GM-CSF Microplate	已包被抗体的96孔聚苯乙烯	1块	将未使用的板条放回带有干燥剂的铝箔袋中密封后，置于2-8℃储存，30天
Human GM-CSF标准品	Human GM-CSF标准品（冻干）	2支	溶解后，计算用量分装，可在-20℃储存14天
Human GM-CSF检测抗体	Human GM-CSF检测抗体（冻干）	1支	浓缩体积溶解后，可在2-8℃储存14天
40×SA-HRP	链霉亲和素-HRP（40×）	1支	40倍浓度于2-8℃保存；1倍工作浓度不建议保存
10×浓缩稀释用缓冲液	浓缩稀释用缓冲液（10×），6ml	1瓶	开封后，2-8℃储存，30天
显色液	TMB底物	1瓶	
终止液	6ml 强酸，用于破坏HRP酶结构	1瓶	
25×浓缩洗涤缓冲液	浓缩洗液，20ml/瓶	1瓶	
封板膜	96孔板封板膜	3张	常温存放，为避免污染，不可重复使用

2. 实验所需自备试验器材

- 酶标仪（可测量 450nm 检测波长的吸收值及 540nm 或 570nm 校正波长的吸收值）
- 高精度加液器及一次性吸头
- 蒸馏水或去离子水
- 洗瓶（喷瓶）、多通道洗板器或自动洗板机
- 500mL 量筒

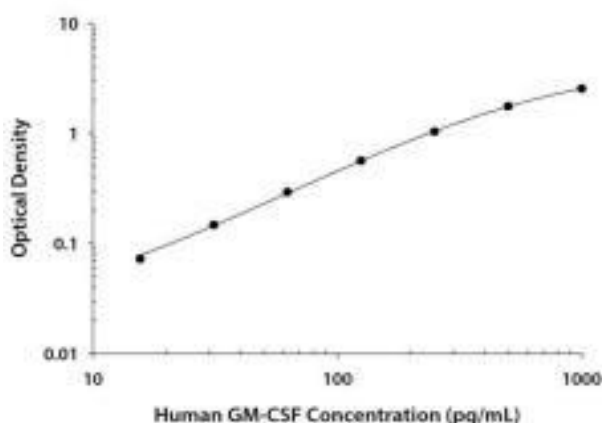
3. 注意事项

试剂盒中的终止液是酸性溶液，使用时请做好眼镜、手、面部及衣服的保护。

四、实验

1. 实验标准

提供的标准曲线数据仅供参考，应根据同次试验所绘标准曲线计算样本含量。



2. 实验前准备

1) 样品收集及储存

细胞培养上清: 颗粒物应通过离心去除; 立刻检测样本。样本收集后若不及时检测, 建议按一次使用量分装, 冻存于 -20°C 冰箱内, 避免反复冻融。样本可能需要用稀释剂(1×) 稀释。

血清: 使用血清分离管(SST)收集样本, 样品室温放置 30 分钟。离心 15 分钟, 转速为 1000 g。立即取出血清, 并立即检测。样本收集后若不及时检测, 建议按一次使用量分装, 冻存于 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 冰箱内, 避免反复冻融。样本可能需要用稀释剂(1×) 稀释。

血浆: 使用 EDTA、肝素或柠檬酸作为抗凝血剂收集血浆, 在收集后 30 分钟内离心 15 分钟, 转速为 1000 g, 并立即检测。样本收集后若不及时检测, 建议按一次使用量分装, 冻存于 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 冰箱内, 避免反复冻融。样本可能需要用稀释剂(1×) 稀释。

2) 检测前准备工作

使用前请将所有试剂和样本放置于室温, 静置 15 分钟。建议所有的实验样本和标准品做复孔检测

1×洗涤液配制: 试剂盒中的浓缩洗涤液为25×母液, 使用前需使用蒸馏水稀释为1×工作液。**例:** 取10ml浓缩洗涤液+240ml蒸馏水定容至250mL, 实际操作时可先计算使用量, 再进行配制。

1×稀释用缓冲液配制: 试剂盒中的浓缩稀释用缓冲液为10×母液, 使用前需使用蒸馏水稀释至1×工作液。**例:** 取3ml浓缩稀释用缓冲液+27ml蒸馏水定容至30mL。实际操作时可先依据样本稀释倍数, 计算所需的稀释用缓冲液用量, 再进行配制。

检测抗体: 将干粉离心至管底, 使用110μL稀释用缓冲液(1×)溶解, 室温静置5min后得到100×母液; 使用前需稀释为1×工作液。按照每孔用量100μL计算所需体积。**例:** 使用了10个孔, 则取10μL的100倍工作浓度的检测抗体, 使用稀释用缓冲液(1×)定容至1mL, 得到1ml的1×工作浓度的检测抗体。

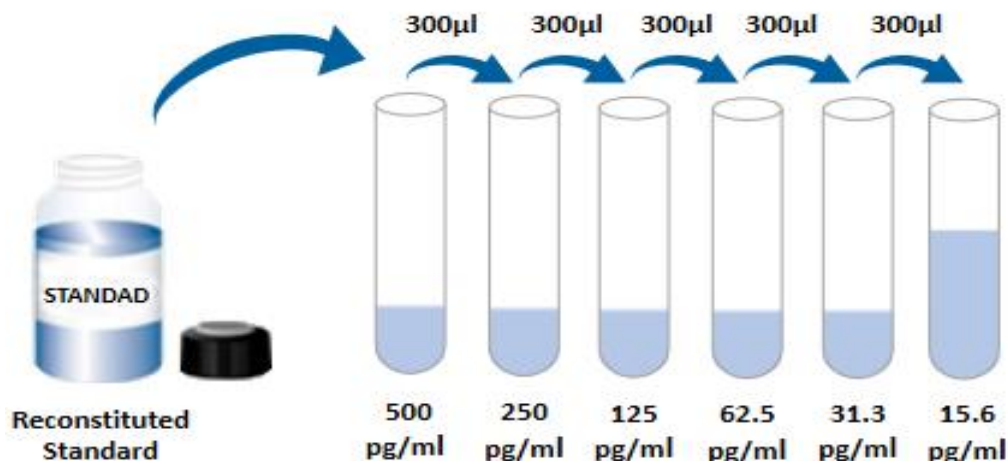
SA-HRP: SA-HRP为40×母液, 使用前需使用稀释缓冲液(1×)稀释配制成1×工作液, 每孔所需量为100 μL。**例:** 使用了10个孔, 则取25μL的40×母液+975μL稀释用缓冲液(1×)定容至1mL, 得到1ml的1×工作浓度的检测抗体。

显色剂: 按每孔100 μL, 计算当次试验所需要用量, 取出相应体积的显色剂, 避光; 取出的显色剂仅供当日使用。

标准品: 冻干标准品用稀释用缓冲液(1×)重溶, 重溶体积1000μL, 得到浓度为

1000pg/mL 标准品母液。轻轻震荡至少 5 分钟，其充分溶解。

每个稀释管中加入 300 μ L 稀释用缓冲液（1 $\times$ ）。将标准品母液参照下图做系列稀释，每管须充分混匀后再移液到下一管。没有稀释的标准品母液可用作标准曲线最高点（1000pg/mL），稀释用缓冲液（1 $\times$ ）可用作标准曲线零点（0 pg/mL）。



3. 实验操作步骤

- 1) 准备好所有需要的试剂和标准品；
- 2) 从已平衡至室温的密封袋中取出微孔板，未用的板条请放回铝箔袋内，重新封口；
- 3) 向微孔板中加入300 μ L洗涤液，静置浸泡30秒，弃掉洗液在吸水纸上将微孔板拍干，请立即使用不要让微孔板干燥；
- 4) 分别将不同浓度标准品，实验样本或者质控品加入相应孔中，每孔 100 μ L。用封板胶纸封住反应孔，室温孵育 2 小时；
- 5) 将板内液体吸去，使用洗瓶、多通道洗板器或自动洗板机洗板。每孔加洗涤液 300 μ L，然后将板内洗涤液吸去。重复操作 3 次。每次洗板尽量吸去残留液体会有助于得到好的实验结果。最后一次洗板结束，请将板内所有液体吸干或将板倒置，在吸水纸拍干所有残留液体；
- 6) 在每个微孔内加入 100 μ L 检测抗体。用封板胶纸封住反应孔，室温孵育 2 小时；
- 7) 重复第 5步洗板操作；
- 8) 在每个微孔内加入 100 μ L SA-HRP，室温孵育 20 分钟。注意避光；
- 9) 重复第 5 步洗板操作；
- 10) 在每个微孔内加入 100 μ L 显色液，室温孵育 5-30 分钟，注意避光；
- 11) 在每个微孔内加入 50 μ L 终止液，孔内溶液颜色会从蓝色变为黄色。如果溶液颜色变为绿色或者颜色变化不一致，请轻拍微孔板，使溶液混合均匀；
- 12) 加入终止液后 30 分钟内，使用酶标仪测量 450nm 的吸光度值，设定 540nm 或 570nm 作为校正波长。如果没有使用双波长校正，结果准确度可能会受影响；
- 13) 计算结果：将每个标准品和样品的校正吸光度值(OD₄₅₀-OD₅₄₀/OD₅₇₀)、复孔读数取平均值，然后减去平均零标准品 OD 值。使用计算机软件作四参数逻辑(4-PL)曲线拟合创建标准曲线。另一种方法是，可以通过绘制标准品浓度做对数与相应 OD 值对数生成曲线，并通过回归分析确定最佳拟合线。这个过程可生成一个足够使用但不太精确的数据拟合。若样本经过稀释，计算浓度时应乘以稀释倍数。

五、试剂盒参数

1. 灵敏度

人 GM-CSF 的最低可测剂量 (MDD) 一般在 0.089-0.740pg/mL。

最低可测值是根据 20 个标准曲线零点吸光值的平均值加两倍标准差计算得到的相对浓度。

2. 校正

此 ELISA 试剂盒经大肠杆菌表达的高纯度重组人 GM-CSF 蛋白校正。

3. 线性

4 个不同的样本中掺入高浓度的人 GM-CSF，然后用稀释剂 (1×) 将样本稀释到检测范围内，测定其线性。

稀释倍数	平均值/期待值 (%)	范围 (%)
1:2	104	99-110
1:4	105	96-113
1:8	109	104-112
1:16	98	96-100

4. 特异性

此 ELISA 法可检测天然及重组人 GM-CSF 蛋白。将以下因子用稀释剂 (1×) 配制成 50 ng/mL 的浓度来检测与人 GM-CSF 的交叉反应。将 50 ng/mL 的干扰因子掺入中间范围的重组人 GM-CSF 对照品中，来检测对人 GM-CSF 的干扰。没有观察到明显的交叉反应或干扰。

重组人蛋白	重组小鼠蛋白
G-CSF	GM-CSF
GM-CSF R α	IL-4
GM-CSF R β	IL-3
IL-3	IL-5
IL-3 R α	
IL-4	
IL-4 R α	
IL-5	
IL-5 R α	
M-CSF	

六、常见问题解析

1. 白板（显色完成后，无颜色出现）

序号	可能原因	解决方案
1	试剂盒储存不当；不同试剂盒试剂混用	购买新的试剂盒，注意储存条件；不可混用
2	孵育温度低，时间短	如果温度偏低，则延长孵育时间和显色时间
3	错加、漏加试剂	严格按照说明书步骤添加正确试剂
4	用于配置溶液的容器不干净，或水有问题	使用干净容器以及合格的蒸馏水
5	洗板过程中浸泡时间长，洗板次数太多，洗板冲击力大	严格按说明书操作
6	试剂温度不均一	所有试剂要室温平衡 30 min
7	检测抗体和/或 HRP 浓度太低	参照说明书，不可随意稀释

2. 花板（空白、阴性阳性对照正常，但标本孔OD值明显偏高）

序号	可能原因	解决方案
1	洗涤次数少，不充分	按说明书要求洗涤
2	底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺（TMB）被金属离子或氧化剂污染或曝光	配置时使用干净容器以及合格蒸馏水；避光保存
3	孵育温度高和/或时间过长	控制孵育和最后酶促反应的温度和时间
4	加样时未更换枪头，造成交叉污染	每个样都更换枪头
5	附近孔交叉污染	垂直拍板，使用合适的拍板纸，避免孔内进入纸屑尘
6	样本存在内源性干扰物质	推测可能的感染物质，并进行对应处理
7	样本溶血、贮存过久、凝集不全、被细菌污染、采血管中添加物影响	避免溶血、污染、过久储存等现象

七、总体步骤图

