

## 人GDF-15双抗夹心ELISA检测试剂盒

请在实验前仔细阅读本说明书

产品货号: KE00108  
规格: 96T  
灵敏度: 0.3 ng/mL  
检测范围: 1.25 - 40 ng/mL  
用途: 此试剂盒用于定量检测血清、血浆、细胞上清以及尿液中人GDF-15浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

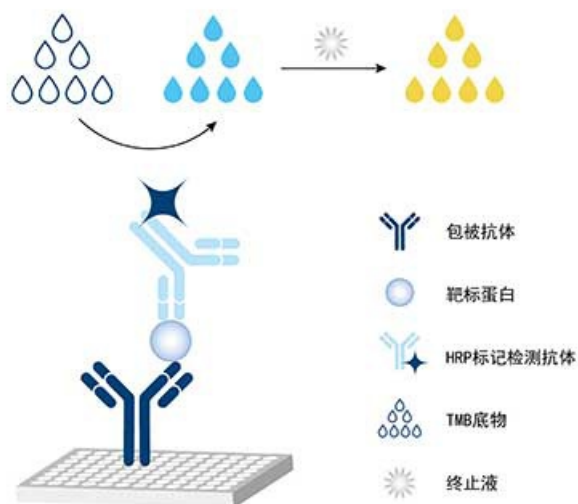
# 目录

一：背景信息	3
二：检测原理	3
三：需自备的实验器材	3
四：试剂盒组分及储存	4
五：实验注意事项	4
六：样本准备	4
七：试剂准备	5
八：实验步骤	6
九：实验参数	7
9.1 参考标曲图	7
9.2 精密度	7
9.3 加标回收率	8
9.4 样本值	8
9.5 灵敏度	8
9.6 线性	9
十：参考文献	9

## 一：背景信息

生长分化因子 15 (GDF-15)，也称为巨噬细胞抑制性细胞因子 1 (MIC-1)，是TGF- $\beta$ 超家族的成员，与缺氧、炎症和氧化应激有关。GDF-15是一种应激诱导的细胞因子，生理状态下只在前列腺和胎盘中高表达，心脏组织表达微弱，但是在急性呼吸窘迫综合征、肺动脉高压和心力衰竭等应激状态下GDF-15在心肌细胞中大量表达。GDF-15水平与心血管疾病、癌症和炎症性疾病的诊断关系密切。

## 二：检测原理



### ◀双抗夹心模式图 (检测抗体直标HRP)

按操作顺序形成抗体夹心结构后，加入TMB底物，板孔液体由无色变成蓝色，再加入终止液液体变为黄色后进行吸光度值测定。

## 三：需自备的实验器材

- 3.1 酶标仪 (可读取450 nm和630 nm双波长);
- 3.2 高精度移液器及一次性移液器枪头;
- 3.3 洗板机 (亦可手动洗板);
- 3.4 EP管 (用于稀释标准品及样本);
- 3.5 吸水毛巾或滤纸 (用于拍干);
- 3.6 烧杯和量筒;
- 3.7 用于ELISA实验的数据分析的统计拟合软件 (推荐四参数拟合方法)，如：Origin，ELISA Calc等。

## 四：试剂盒组分及储存

英文名称	中文名称	规格	数量
Microplate	预包被酶标板 - 96孔板	8孔 × 12条	1 块
Protein standard	标准品 - 冻干粉状 *	80 ng/瓶	2 瓶
Detection antibody, HRP-conjugated (100×)	HRP标记检测抗体浓缩液 (100×) **	120 μL/支	1 支
Sample Diluent PT 1	样本稀释液 PT 1 (用于人血清、血浆以及尿液样本)	30 mL/瓶	1 瓶
Sample Diluent PT 6	样本稀释液 PT 6 (用于细胞上清样本)	30 mL/瓶	1 瓶
Detection Diluent	抗体稀释液	30 mL/瓶	1 瓶
Wash Buffer Concentrate (20×)	浓缩洗涤液 (20×)	30 mL/瓶	1 瓶
Tetramethylbenzidine Substrate (TMB)	显色底物 TMB	12 mL/瓶	1 瓶
Stop Solution	终止液	12 mL/瓶	1 瓶
Plate Cover Seals	封板膜		4 张

**储存条件：**  
1：未开启试剂盒可在2-8℃条件下存放6个月或者在-20℃条件下存放1年  
2：已开启试剂盒可在2-8℃存放7天  
3：每次实验均使用新的标准品,使用后丢弃

\* 使用对应的样本稀释液对标准品进行复溶，复溶过程避免产生气泡

\*\* 开盖前请离心

## 五：实验注意事项

- 5.1 避免皮肤接触终止液以及TMB 显色液；
- 5.2 在实验过程中，注意穿戴个人防护装备，如实验服，手套，口罩和护目镜；
- 5.3 请勿将不同批次的试剂进行混用，过期产品请勿使用；
- 5.4 在使用自动洗板机时，板孔加入洗涤液之后，设置30秒的浸泡程序，以提高分析的精确度。

## 六：样本准备

- 6.1 血清：全血标本室温凝固 30 min后1000×g 离心15 min，取上清立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融。
- 6.2 血浆：可用EDTA、肝素或柠檬酸盐作为抗凝剂，标本采集后1000×g 离心15 min，立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融  
(注意：标本溶血会影响检测结果，因此溶血标本不宜进行检测)。
- 6.3 细胞上清：收集细胞培养液，500×g 离心5 min取上清，立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融。
- 6.4 尿液：收集尿液后，1000×g离心20 min，取上清，立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融。

## 七：试剂准备

### 7.1 洗涤液 (1×)：

如果洗涤液 (20×) 有晶体析出, 37°C加热至晶体全部溶解。按1:20稀释倍数进行稀释: 如取30 mL 浓缩洗涤液 (20×), 加入570 mL 超纯水或去离子水, 得到洗涤液 (1×)。

### 7.2 HRP标记检测抗体 (1×)：

开盖前瞬时离心, 按1:100比例进行稀释, 稀释前根据预先计算实验所需的总量配制 (100 μL/孔), 实际配制时应多配制0.1-0.2 mL。如10 μL HRP标记检测抗体浓缩液 (100×) 加 990 μL 抗体稀释液进行配制, 轻轻混匀。

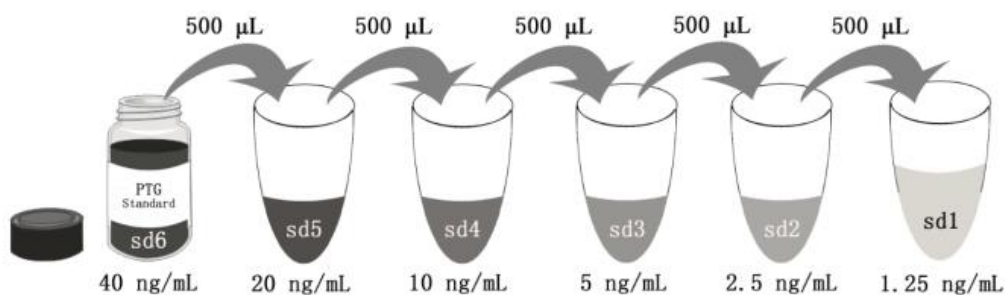
### 7.3 待检测样本：

不同的样本使用相应的样本稀释液进行稀释, 如果样本检测值超过标曲最高范围, 可将样本进行一定的稀释后再进行实验, 使样本的检测值处于标曲范围内, 不同样本的稀释倍数需自行优化。

稀释比推荐如下: 人血清、血浆1:2或1:4稀释; 尿液1:2稀释。样品采集、处理和储存的差异可能导致测值的改变。

### 7.4 梯度稀释的标准品：

检测人血清、血浆以及尿液样本, 使用2 mL PT 1 样本稀释液复溶标准品。检测细胞上清样本, 使用2 mL PT 6 样本稀释液复溶标准品, 具体操作如下:



Add # μL of Standard diluted in the previous step	—	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL
# μL of Sample Diluent PT 1 or PT 6	2000 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL
	"sd6"	"sd5"	"sd4"	"sd3"	"sd2"	"sd1"

## 八：实验步骤

实验前,需要将所需试剂在室温平衡20-30 min (HRP标记 检测抗体浓缩液不需要平衡室温,即用即取);在进行标准品、样本以及不同试剂加样时,更换枪头,避免接触微孔板的内表面,不同的试剂,使用不同的加样槽。

8.1 根据实验用量,取出需要用到的酶标板条,剩余板条加入干燥剂放入铝箔袋密封后存放于4°C,并于一周之内用完;

8.2 加样,分别设零孔、标准孔、待测样本孔。零孔加样本稀释液100  $\mu$ L,余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本100  $\mu$ L/孔,注意不要产生气泡(建议标准品和样本都做复孔,尽量避免实验误差,确保上样不间断,5-10 min完成加样);

8.3 酶标板盖上覆膜,37°C孵育2 h;

8.4 洗涤

1) 揭开封板膜(动作轻柔,避免动作过大导致液体溢出串孔),弃液体,拍干;

2) 洗涤液(1 $\times$ )洗涤板条,每孔350-400  $\mu$ L,洗涤后,甩掉液体拍干板条,重复此步骤4次,避免异物进入板孔以及板条干燥;

8.5 每孔加100  $\mu$ L HRP标记检测抗体(1 $\times$ )(参照试剂准备部分7.2),盖上封板膜,37°C孵育40 min;

8.6 重复步骤8.4;

8.7 显色:每孔加TMB显色液100  $\mu$ L,37°C避光显色 15-20 min(如果颜色偏浅,可适当延长显色时间,不超过30 min;保持显色底物始终处于避光状态,显色底物在加样前应是无色透明,如有变色,请勿使用);

8.8 终止:每孔加终止液100  $\mu$ L,蓝色变黄色。终止液与TMB显色液的加样顺序一致;(注意:眼睛和皮肤避免接触终止液)

8.9 读数:以630 nm为校正波长,用酶标仪在450 nm波长测量各孔的光密度(OD值)。加入终止液后5 min内进行读数,若无630 nm波长,也可直接使用450 nm 波长读数;

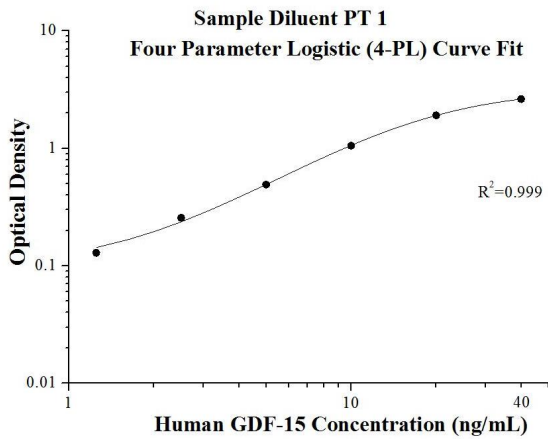
8.10 数据分析:每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值,设置复孔,取其平均值。以标准品的浓度为横坐标,OD值为纵坐标,使用专业软件(如Origin、ELISACalc等)进行四参数拟合(4-PL),根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度,乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

操作流程如下:

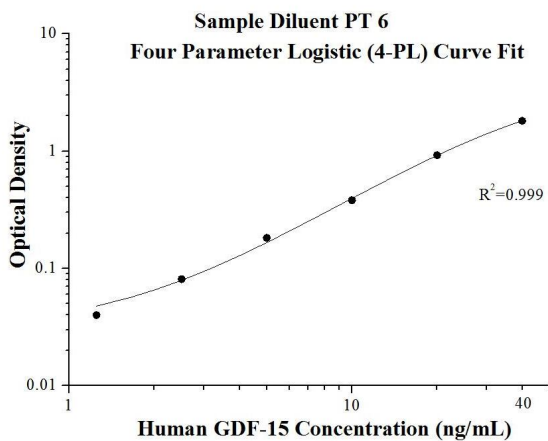
步骤	试剂	体积	孵育时间	洗涤次数	孵育温度
1	标准品或样本	100 $\mu$ L	120 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
2	HRP标记检测抗体(1 $\times$ )	100 $\mu$ L	40 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
3	显色 TMB	100 $\mu$ L	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37°C孵育,避光
4	终止液	100 $\mu$ L	0 分钟	不需要洗涤	-
5	加入终止液后以630 nm为校正波长,在450 nm处测量OD值,此过程建议不超过5分钟				

## 九：实验参数

### 9.1 参考标曲图



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.106 0.107	0.107	-
1.25	0.239 0.232	0.236	0.129
2.5	0.367 0.357	0.362	0.256
5	0.599 0.597	0.598	0.491
10	1.167 1.15	1.159	1.052
20	2.012 2.016	2.014	1.908
40	2.743 2.878	2.73	2.624



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.094 0.093	0.094	-
1.25	0.13 0.13	0.13	0.037
2.5	0.173 0.176	0.175	0.081
5	0.278 0.273	0.276	0.183
10	0.506 0.444	0.475	0.382
20	1.032 0.999	1.016	0.922
40	1.914 1.897	1.906	1.812

### 9.2 精密度

板内精密度：3个不同浓度的样本在板内重复测定 20次；

板间精密度：3个不同浓度的样本在板间重复测定 24次。

板内精密度 (CV内)				
样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%
1	20	6.4	0.6	9.4
2	20	15.1	1.6	10.4
3	20	40.6	2.9	7.1

板间精密度 (CV间)				
样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%
1	24	6.8	0.4	5.1
2	24	13.9	0.9	6.3
3	24	42.5	1.4	3.3

### 9.3 加标回收率

样本稀释后，在标曲范围内选择高、中、低3个浓度，进行人GDF-15的加标回收率实验，结果如下：

样本类型	稀释倍数	均值 (%)	范围 (%)
人血清	1:4	78	73-84
	1:8	88	82-91
人血浆	1:4	76	71-84
	1:8	82	78-92
细胞上清	1:2	107	93-117
	1:4	106	95-119
尿液	1:2	88	73-99
	1:4	83	77-89

### 9.4 样本值

应用此试剂盒检测人的血清、血浆以及尿液样本中人GDF-15浓度，结果如下：

样本类型	均值 (ng/mL)	检出率 (%)	范围 (ng/mL)
人血清 (n=16)	35.8	100	8.1-95
人血浆 (n=16)	6.5	100	3.5-13.1
尿液 (n=12)	1.8	31.5	0.3-3.3

**HepG2细胞上清**-在含有10% 胎牛血清、2.5 mM L-谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素和 100 µg/mL 硫酸链霉素的DMEM培养基中培养人肝癌细胞HepG2，收集细胞上清，检测人 GDF-15的浓度为 90 ng/mL。

### 9.5 灵敏度

用20个重复的零孔平均OD值加上两倍标准差得到的OD值带入标准曲线拟合出对应的浓度值，此试剂盒中人GDF-15的灵敏度为 0.3 ng/mL。



## 9.6 线性

人血清、血浆和细胞上清用对应样本稀释液稀释样本，使稀释后的检测值处于标曲范围内，尿液样本加入高浓度的人GDF-15蛋白，梯度稀释后检测样本加标线性，线性数据如下：

(人血浆样本预先稀释8倍；尿液样本预先稀释2倍)

稀释倍数		人血浆 (样本稀释液PT 1)	人血清 (样本稀释液PT 1)	细胞上清 (样本稀释液PT 6)	尿液 (样本稀释液PT 1)
1:2	均值 (%)	83	76	100	107
	范围 (%)	82-84	74-78	-	97-116
1:4	均值 (%)	93	94	107	118
	范围 (%)	79-100	89-100	106-108	114-123
1:8	均值 (%)	89	104	111	100
	范围 (%)	72-100	100-107	110-112	99-101
1:16	均值 (%)	-	121	116	-
	范围 (%)	-	119-124	114-118	-

## 十：参考文献

1. Bootcov MR. et al.(1997). Proc Natl Acad Sci U S A. 94(21):11514-9.
2. Ding Q. et al. (2009). Endocrinology. 150(4):1688-96.
3. Clark BJ. et al. (2013). Crit Care. 17(3):R92.
4. Kempf T. et al. (2013). Crit Care. 173. doi: 10.
5. Chen Q. et al. (2016). Cytokine. 83:226-230.