

## Speedy™ 人GHR一步法ELISA检测试剂盒

请在实验前仔细阅读本说明书

产品货号: SE50224  
规格: 96T  
灵敏度: 25.1 pg/mL  
检测范围: 39-2500 pg/mL  
用途: 此试剂盒用于定量检测血清和血浆中人GHR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    | 8 |
| 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 |
| 9.7 特异性    | 9 |
| 十：参考文献     | 9 |

## 一：背景信息

生长激素（GH）是一种具有多效作用的肽类激素，其功能涵盖代谢调节、生长发育、认知功能、免疫系统、心肾系统及肠道功能。GH主要通过改变基因表达发挥这些作用，该过程始于其膜受体GHR的激活，进而激活相关的JAK2和Src家族激酶。生长激素受体（GHR）属于细胞因子受体家族成员。GHR基因突变与拉隆综合征（又称生长激素不敏感综合征GHIS）相关，该病症特征为身材矮小。

## 二：检测原理



抗标签抗体预先包被于板孔，可结合带标签的捕获抗体。抗原或样本、捕获抗体及辣根过氧化物酶（HRP）标记的检测抗体加入后，在溶液中形成夹心复合物。在HRP催化下，四甲基联苯胺（TMB）使底物溶液由无色变蓝，加入终止液后变黄。溶液颜色深浅与结合蛋白量成正比。测量波长为450 nm，校正波长为630 nm。

## 三：需自备的实验器材

- 3.1 酶标仪（可读取450nm和630nm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，也可使用Proteintech 公司数据分析网站：<https://www.ptgcn.com/products/elisa-kits/>；
- 3.8 微孔板恒温振荡器。

## 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 *            | 10000 pg/瓶 | 2 瓶 |
| Capture antibody (100×)  | 捕获抗体浓缩液 (100×) **       | 60 μL/支    | 1 支 |
| Detection antibody, HRP-conjugated (100×)  | HRP 标记检测抗体浓缩液 (100×) ** | 60 μL/支    | 1 支 |
| Sample Diluent PT 1  | 样本稀释液 PT 1              | 30 mL/瓶    | 1 瓶 |
| Detection Diluent  | 抗体稀释液                   | 15 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 |
| <b>储存条件：</b><br>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<br>2：已开启试剂盒可在2-8℃存放7天<br>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，详见7.4部分，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)。

## 七：试剂准备

### 7.1 洗涤液 (1×) 的配制:

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1×洗涤液。

### 7.2 抗体混合液 (1×) 的配制:

开盖前瞬时离心, 将捕获抗体和检测抗体稀释分别按1:100比例稀释到同一管稀释液中, 配制检测所需的工作液。例如: 将50 μL包被抗体浓缩液 (100×) 和50 μL检测抗体浓缩液 (100×) 加入 4900 μL抗体稀释液, 混匀配制成1×抗体混合液。

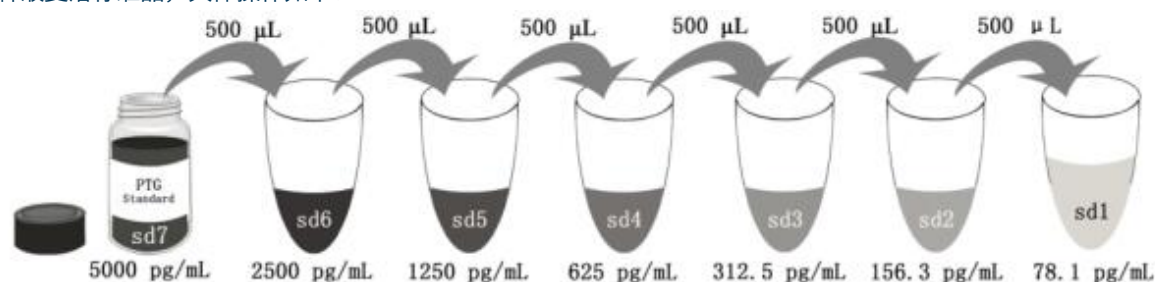
### 7.3 待检测样本:

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: 人血清和血浆样本1:16或1:32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:

用2 mL PT 1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 | 500 μL |
| # μL of Sample Diluent PT 1                       | 2000 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL |
|   | "sd7"   | "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 (捕获抗体浓缩液和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50  $\mu$ L,余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本50  $\mu$ 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 每孔加50  $\mu$ L 抗体混合液(1 $\times$ )(参照试剂准备部分7.2),盖上封板膜,恒温振荡器上37°C 400 rpm 孵育 1 h(若无恒温振荡器,此步骤建议37°C静置孵育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;

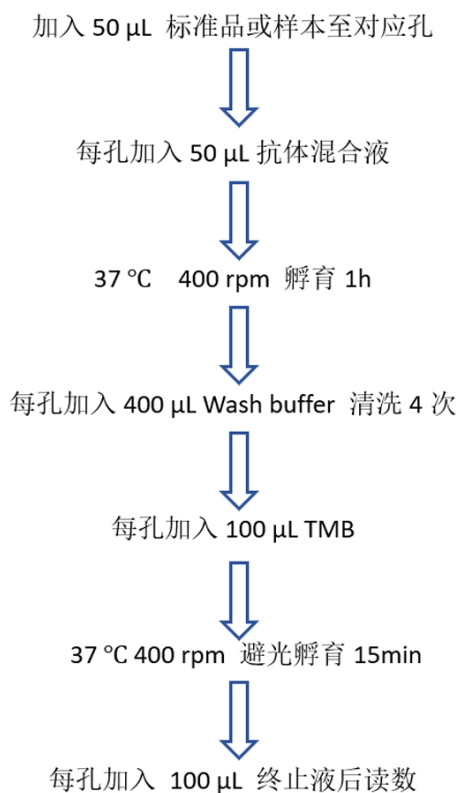
8.5 显色:每孔加TMB显色液100  $\mu$ L,恒温振荡器上37°C 400 rpm 孵育15-20 min(如果颜色偏浅,可适当延长显色时间,不超过30 min;保持显色底物始终处于避光状态,显色底物在加样前应是无色透明,如有变色,请勿使用);

8.6 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)

8.7 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;

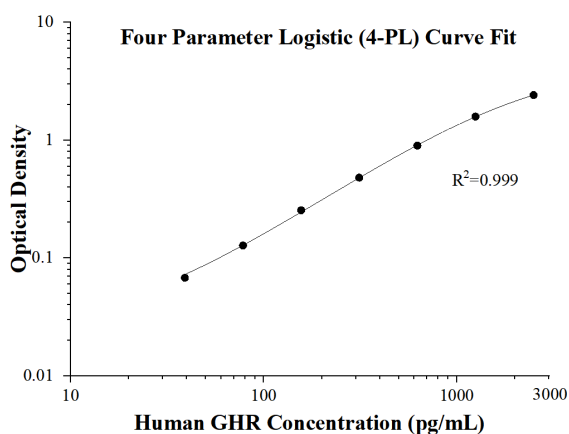
8.8 数据分析:每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值,设置复孔,取其平均值。以标准品的浓度为横坐标,OD值为纵坐标,使用专业软件(如Origin、ELISACalc等)进行四参数拟合(4-PL),根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度,乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

操作流程如下：



## 九：实验参数

### 9.1 参考标曲图



| (pg/mL) | O.D              | Average | Corrected |
|---------|------------------|---------|-----------|
| 0       | 0.0198<br>0.0207 | 0.0203  | -         |
| 78.1    | 0.0756<br>0.0797 | 0.0777  | 0.0574    |
| 156.3   | 0.1342<br>0.1403 | 0.1373  | 0.1170    |
| 312.5   | 0.2502<br>0.2541 | 0.2522  | 0.2319    |
| 625     | 0.4905<br>0.4886 | 0.4896  | 0.4693    |
| 1250    | 0.9042<br>0.9123 | 0.9083  | 0.8880    |
| 2500    | 1.6748<br>1.6778 | 1.6763  | 1.6561    |
| 5000    | 2.5398<br>2.5721 | 2.5560  | 2.5357    |

## 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 8 次;

板间精密度: 3个不同浓度的样本在板间重复测定 16 次。

| 板内精密度 (CV内) |    |             |      |         | 板间精密度 (CV间) |    |             |      |         |
|-------------|----|-------------|------|---------|-------------|----|-------------|------|---------|
| 样本          | 数量 | 平均值 (pg/mL) | 标准差  | 变异系数CV% | 样本          | 数量 | 平均值 (pg/mL) | 标准差  | 变异系数CV% |
| 1           | 8  | 2,764.2     | 43.7 | 1.6     | 1           | 16 | 2,717.1     | 65.2 | 2.4     |
| 2           | 8  | 681.5       | 11.7 | 1.7     | 2           | 16 | 687.2       | 13.4 | 1.9     |
| 3           | 8  | 338.8       | 8.5  | 2.5     | 3           | 16 | 341.0       | 12.8 | 3.8     |

## 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GHR的加标回收率实验, 结果如下:

| 样本类型 | 稀释倍数  | 平均值 (%) | 范围 (%) |
|------|-------|---------|--------|
| 人血清  | 1:128 | 103     | 97-106 |

## 9.4 样本值

人血清 - 应用本试剂盒, 检测人血清样本中人GHR的浓度。

| 样本类型       | 平均值 (ng/mL) | 范围 (ng/mL) |
|------------|-------------|------------|
| 人血清 (n=16) | 22.3        | 11.4-51.1  |

## 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GHR的灵敏度为25.1 pg/mL。

## 9.6 线性

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，线性数据如下：

(人血清样本预先稀释8倍。)

|      |        | 人血清     |
|------|--------|---------|
| 1:2  | 均值 (%) | 100     |
|      | 范围 (%) | -       |
| 1:4  | 均值 (%) | 102     |
|      | 范围 (%) | 100-104 |
| 1:8  | 均值 (%) | 102     |
|      | 范围 (%) | 99-106  |
| 1:16 | 均值 (%) | 101     |
|      | 范围 (%) | 99-102  |

## 9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组GHR。

## 十：参考文献

1. Waters, Michael J. Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society vol. 28 (2016): 6-10.
2. Guevara-Aguirre, Jaime et al. Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society vol. 38 (2018): 34-38.
3. Rosenbloom, A L. Endocrine vol. 12,2 (2000): 107-19.