

人类成纤维细胞生长因子23检测试剂盒（酶联免疫法）

【产品名称】

通用名称：人类成纤维细胞生长因子 23 检测试剂盒（酶联免疫法）

【包装规格】

96 人份/盒

【预期用途】

本产品仅供科研使用，主要用于检测人成纤维细胞生长因子 23 在血清、血浆或细胞培养基中的水平。

【简介】

成纤维细胞生长因子 23 (FGF-23) 是最近发现的相关蛋白大家族中的新成员。其基因编码为一个 250 个氨基酸的蛋白。FGF-23(氨基酸 1-24)的氨基酸-末端蛋白是疏水的且很可能用作是允许分泌进入血液循环的信号肽。它的羧基-末端蛋白(氨基酸 180-251)与其它 FGF 蛋白家族成员仅有限制的相同氨基酸。FGF-23 是与 FGF-21 (~24% 的氨基酸次序要相同)和 FGF-19 (~22%的氨基酸次序相同) 最接近。

肾脏的磷酸盐流失障碍导致血磷酸盐过少是骨骼矿化和生长板发展缺陷因素之一。有常染色体遗传的低磷血症(ADHR)的病人，罕见的遗传基因混乱，携带制造一种不同变化转变的 FGF-23 的蛋白质的抵抗蛋白水解的裂开。此外，肿瘤能引起瘤原性的骨软化(OOM)已经显示过量表达的 FGF-23 mRNA 产生与其相同的效果并且血中异常浓度的 FGF-23 能导致肾脏的磷酸盐流失障碍。一致的结论，在啮齿动物中应用重组的 FGF-23 显示增加尿中磷的排泄量因此导致血磷酸盐过少和骨软化/佝偻病。总计，所有现在的数据建议 FGF-23 直接或间接与磷酸盐动态平稳规则有关。

测量人 FGF-23 在血液中循环可能提供重要的诊断工具用于实验室评估各种各样不同的血磷酸盐流失障碍，包括瘤原性的骨软化，X-链锁低磷血症性佝偻病和常染色体遗传血磷酸盐过少佝偻病。此外，灵敏地检测 FGF-23 可能提供对骨骼和矿物动态平衡规则的新的见识。

【检验原理】

人 FGF-23 (C-端) ELISA 试剂盒是双位点酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清、血浆或细胞培养中 FGF-23。两个亲合纯化的山羊多克隆抗体经过挑选检测 FGF-23 的羟基-末端(C-端)的抗原决定部位。一个抗体是固定在微量孔中包被。另一个抗体是生物素与辣根过氧化物酶(HRP)与抗生物素蛋白共扼结合检测。包含 FGF-23 的样本与固相捕获抗体和生物素抗体同时在微量孔中孵育。样本中包含的 FGF-23 与捕获抗体和检测抗体免疫结合形成“夹心抗体”复合物：

微量孔/抗人类 FGF—人类 FGF-23—生物素/抗人类 FGF
(C-端) (C-端)

在这个孵育期末，清洗微量孔去除任何未结合抗体和其它物质。固定的夹心抗体复合物与 HRP-抗生物素同步孵育允许酶结合到生物素抗体。在孵育的末期再次清洗微量孔移出未结合的物质。微量孔中的酶结合物与底物溶液同时孵育反应并且用分光光度微量板读数仪检测。抗体复合物结合到微量板中的活性与样本中的 FGF-23 数量成正比。标准曲线由绘制吸光度 VS 每个 FGF-23 标准品的浓度形成线性或对数曲线。样本中人类 FGF-23 的浓度直接从曲线中查找。

【主要组成成份】

1. 人FGF-23抗体包被板(40-6015)

一个板架有12X8个微量孔板条(总共96个微量孔)包被抗体人FGF-23抗体带干燥剂。试剂应贮存在2-8°C并且稳定到试剂盒的有效期。

2. 生物素人FGF-23抗体(40-6020)

一瓶包含5.5 mL生物素已标记上抗人类FGF-23，磷酸盐缓冲液包含蛋白稳定剂和0.1%叠氮钠。试剂应贮存在2-8°C并且稳定到试剂盒的有效期。

3. HRP-生物素(40-6070)

一瓶包含5.5 mL的在TRIS缓冲液中结合生物素的辣根过氧化物酶(HRP)包含蛋白稳定剂，不含叠氮钠，非水银防腐剂。试剂应贮存在2-8°C并且稳定到试剂盒的有效期。

4. 人FGF-23标准(40-6031 to 40-6036)

6瓶，其中5瓶包含人FGF-23干粉蛋白质和0.1%叠氮钠。参照瓶标签上精确地浓度。零点标准液为2 mL可直接使用的液体。其它5瓶标准使用前用1.0 mL的去离子水复溶。允许瓶子直立大约20分钟并且轻轻的温和地旋涡混匀并且倒置。在使用之前确保完全复溶。在复溶之后的标准马上使用；未使用的部分标准冰冻保存。标准在复溶之后当贮存在-20°C或更低时可稳定到试剂盒标签的有效期，少于3个冰冻/解冻循环。

5. 人类FGF-23质控I和II (40-6041 & 40-6042)

2瓶每瓶包含人类FGF-23干粉蛋白质和0.1%叠氮钠。参照瓶标签上精确地浓度。每瓶质控用1.0 mL的去离子水复溶。允许瓶子直立大约20分钟并且轻轻的温和地旋涡混匀并且倒置。复溶后马上使用质控。质控在复溶之后当贮存在-20°C或更低时可稳定到试剂盒标签的有效期，少于3个冰冻/解冻循环。

6. ELISA清洗浓缩液(40-0041)

1瓶包含20 mL的20倍浓缩液。使用之前用去离子水稀释容量到400mL。由稀释产生的工作缓冲液包含非叠氮钠和非银防腐剂的表面活性剂。

7. ELISA HRP底物(40-0022)

1瓶包含21 mL的带有过氧化氢的四甲基联苯胺(TMB)。试剂应贮存在2-8°C避光保存可稳定至试剂盒的有效期。

8. ELISA 终止溶液(40-0030)

1瓶包含11 mL的1 M硫酸。这些试剂能在室温或2-8°C下保存并且稳定至试剂盒的有效期。

9. 板盖(20-2000)

试剂盒内包含3个板盖。

【储存条件及有效期】

收到试剂后试剂盒贮存在 2-8°C；标准和质控在复溶后贮存在-20°C 或更低的温度下。试剂盒的有效期参照试剂盒的标签。所有成份都同样稳定至有效期。所有试剂准备使用之前先放置在室温并且温柔地旋涡和倒置混匀。不同批号的试剂不能组合或交换使用。

【适用仪器】

适用于具有 450nm、650nm 波长的所有全自动、半自动酶标仪。

【样本要求】

测量 FGF-23 浓度使用血清、EDTA 血浆或细胞培养基。需要提供双倍检测 300 微升的血清、血浆或培养基样本。

推荐早晨 12 小时空腹血清样本。允许放置室温下凝固血液以得到血清。离心样本和分离血清、血浆或培养基细胞。样本应马上分析或冰冻保存在-20°C 或更低的温度。避免反复冻融样本。

【检验方法】

必需的物质但未能提供

- 1.0 mL 微量加量器复溶标准和质控。
- 精确加样能准备分配 50 μ L、150 μ L 和 200 μ L。
- 铝袋。
- 重复的分配器适当分配 350 μ L。
- 吸入装置或适当的微量板清洗仪。
- 贮存清洗溶液的容器。
- 分光光度计微量板读数仪能读取 450 和 595nm 的吸光度。
- 去离子水。
- 水平振荡器能维持 180 - 220 RPM。
- 计时器

分析程序

- 放置充足的抗体包被条以供 FGF-23 标准、质控和未知样本检测。
- 吸取 150 μ L 的标准、质控或样本或样本加入到指定的微量孔中。标准或质控在使用后冰冻保存。
- 吸取 50 μ L 的生物素抗体加入到每个微量孔中，并且用一块板盖盖板。
- 在设定为 180 - 220 RPM 的水平振荡器中室温孵育 10 分钟；然后继续孵育固定 18-24 小时。
- 移开板盖。吸取每孔中的容量。分配 350 μ L 的工作清洗溶液到每个微量孔中，清洗每个微量孔 5

次并且彻底地除去微量孔中的物质。更适合使用自动微量板清洗仪。

6. 吸取 200 μL 的 HRP-生物素试剂到每个微量孔中。
7. 用铝袋和板盖重新盖上微量板。在设定为 180 - 220 RPM 的水平振荡器中室温孵育 60 分钟。
8. 移开铝袋和板盖。吸取每个微量孔的物质，分配 350 μL 的工作清洗溶液到每个微量孔中，清洗每个微量孔 5 次并且彻底地除去微量孔中的物质，应使用自动微量板清洗仪。
9. 加入 200 μL 的 ELISA HRP 底物到每个微量孔中。
10. 用铝袋和板盖重新盖上微量板。在设定为 180 - 220 RPM 的水平振荡器中室温孵育 30 分钟。
11. 移开铝袋和板盖。在 5 分钟内，用微量板读数仪在 595nm 读取结果，用 0 RU/mL 标准微量孔作为空白值。
12. 立即吸取 50 μL 的 ELISA 终止溶液到每个微量孔中。在水平振荡器中混匀 1 分钟。
13. 在 10 分钟内用微量板读数仪在 450nm 波长下读取结果，试剂空白用 200 μL 的底物和 50 μL 的终止液。

如果波长可允许修正，设定仪器参数为双波长设置在 450nm 测量，设置 595nm 作为底色波长校正。

【参考值（参考范围）】

【检验结果的解释】

在ELISA终止液加入前后读取两个吸光度，允许使用试剂盒内的人类FGF-23标准建立两条标准曲线。参照瓶标签上精确地浓度。第一曲线用于结果的校正是加入ELISA终止液后和在450nm波长下第二次读取吸光度。这些数据是利用开始五个标准的吸光度值。开始读取的在加入ELISA终止液之前和在595nm读取的吸光度值是在于扩大第6个标准（最高的浓度）的分析范围。仅在样本的结果超过第五个标准值时才应运这个曲线。第一次读取包含的结果不能替代在450nm上读取的结果。每个曲线按以下方式产生：

第一曲线程序 — 在450nm读取

1. 计算每个双孔中的平均吸光度。
2. 从其它所有的平均吸光度减去0 RU/mL标准液的平均吸光度以获得校正的吸光度。
3. 标准曲线的由纵座标上修正的开始五个吸光度和横座标标准浓度绘制线性或log-log图。适当的电脑辅助数据处理程序能帮助计算结果。FGF-23质控和样本根据他们校正后的吸光度直接从标准曲线上读取浓度。如果使用log-log图纸或电脑辅助数据处理程序，样本的吸光度由0 RU/mL标准和最高标准之间校正应根据以下公式计算：

$$\text{未知值} = \frac{\text{校正的吸光度 (未知)}}{\text{校正的吸光度 (2}^{\text{nd}} \text{标准)}} \times 2^{\text{nd}} \text{标准值}$$

第二曲线程序 — 在595nm读取

1. 计算每个双孔中的平均吸光度。
2. 标准曲线是由纵座标三个最高浓度的标准和横座标标准浓度绘制线性或log-log图。
3. 样本中FGF-23浓度读取高于第五个标准直接从这个标准曲线图中读取结果。

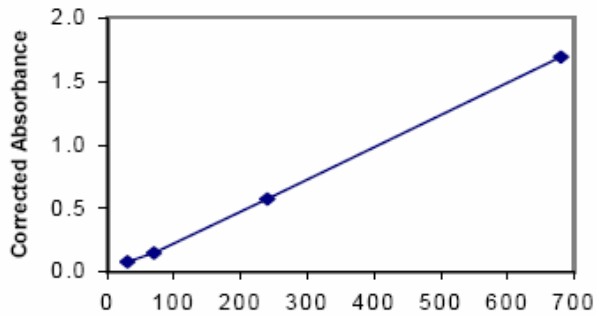
实例数据和标准曲线

以下是典型的数据例子和结果的标准曲线的第一曲线程序和第二曲线程序。这些曲线不能替代每次分析中执行的标准曲线。

第一分析- 450 nm

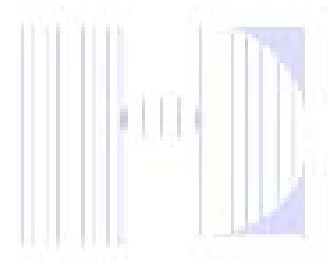
第一分析-450nm				
微量孔号	ABS	平均ABS	校正ABS	结果RU/mL
试剂空白	0.000	0.000		
	0.000			

0 RU/mL	0.109			
	0.111	0.110	0.000	
30 RU/mL	0.183			
	0.194	0.191	0.081	
70 RU/mL	0.256			
	0.266	0.261	0.151	
240 RU/mL	0.684			
	0.683	0.684	0.574	
680 RU/mL	1.853			
	1.748	1.801	1.691	
Control I	0.234			
	0.235	0.235	0.125	55.3
Control II	0.434			
	0.447	0.441	0.331	157
Sample1	0.577			
	0.589	0.583	0.473	219
Sample2	2.028			
	2.101	2.065	1.955	*
人类FGF-23 (C-Term) ELISA 第一曲线分析				
* > 680 RU/mL。使用第二曲线分析校正。				



第二分析-595nm

微量孔号	ABS	平均ABS	结果RU/mL
0 RU/mL	0.000		
	0.000	0.000	
240 RU/mL	0.103		
	0.097	0.100	
680 RU/mL	0.314		
	0.318	0.316	
2300 RU/mL	1.148		
	1.119	1.134	
样本2	0.619		
	0.649	0.633	1307



【检验方法的局限性】

1. 最低测量人类 FGF-23 的浓度是 3.0 RU/mL(分析灵敏度)和最高测量人类 FGF-23 没有稀释样本的值是最高标准的浓度。
2. 人类 FGF-23 (C-Term) ELISA 试剂盒已经被优化以至没有最高的“前带效应”在异常样本时不会出现。样本水平在最高标准品浓度和 600,000 RU/mL 之间水平的样品将读出高于最高标准品的值，所以应该用 0 RU/mL 标准进行 1:10 或更大比例的稀释并重分析以得到正确值。
3. 很多脂血的血清或血浆样本将影响免疫学反应并且推荐这样的样本获得结果必须仔细观察。
4. 样本和标准之间的蛋白浓度和蛋白类型的差异是一个免疫分析的“蛋白效应”并有剂量误差。当测定低蛋白浓度的培养基样本对应高蛋白浓度的标准，推荐类似的样本一齐分析将差异降到最低。

【产品性能指标】

准确性:

这次没有合成的或纯天然标准长度的FGF-23作为标准提供。这个试剂盒利用已经分泌出FGF-23的细胞培养清液层稀释用于抗原的来源作为标准校正。分泌的FGF-23是一个多分子形式；同质性、质量和比率是未知的。标准和质控的浓度是用参考Units/mL (RU/mL)表达，相关于每批特殊的细胞培养清液层。

灵敏度

人FGF-23 (C-Term) ELISA的灵敏度是20次检测0 RU/mL标准的95%可信区间为3.0 RU/mL。

精密度

为评估批内分析精密度平均值和变异系数，20次检测两个样本每次单独分析。

平均值(RU/mL)	变异系数
52.7	5.0%
140	5.0%

为评估批间分析精密平均值和变异系数，两个样本在18个不同批号试剂中双孔检测分析。

平均值(RU/mL)	变异系数
50.9	5.0%
153	7.3%

平行性

FGF-23的多分子形状和碎片循环在各种各样的磷酸盐流失障碍的病人中是未明确的，因此，使用一系列稀释样本的研究较困难解释现在试剂盒内附标准(看准确性章节)。

一些病人显示当其它有过量的碎片时仍然在系列稀释的回收情况下有良好的平行性。

因此，这时的结果最好的解释是样本之中有相关的连接。

回收

各种不同的FGF-23的值加入到三个不同的人类血清或血浆样本中并且分析。结果用RU/mL表示并显示如下：

样本	原始结果	加入数量	观察结果	期望值	% O/E
1	43.9	240	281	280	100
		480	539	515	105
		720	802	751	107
2	45.1	240	306	281	109
		480	543	516	105
		720	864	752	115
3	36.7	240	311	273	114
		480	508	509	100
		720	666	746	89

【注意事项】

1. 推荐所有标准、质控和样本双孔检测。每个双孔检测的平均吸光度用于减少数据的差异和校正结果。
2. 对光敏感的试剂(例如：HRP-生物素和ELISA HRP底物)放在原始琥珀瓶或其它适当能起避光作用的容器中。
4. 样本和试剂应小心吸取尽量不要在微量孔中引起气泡。
5. 每个试剂加入的次序和时间是重要的因为免疫学和酶学反应是速率反应模式。清洗步骤在整个分析程

序是同样重要的。强烈推荐使用自动微板清洗。所有吸取和清洗步骤应该被运行以致于时间安排尽可能一致。

6. 样本的结果大于最大标准浓度时应用0 RU/mL标准稀释1:10并且重新分析。结果乘以10。(看局限性, # 2)

7. 血浆或细胞培养基样本可能包含纤维蛋白凝结或细胞和碎片。冰冻/融解的血浆样本将加速凝结形成。这些样本必须离心和轻轻倒出除去能引起非特异性的在微量孔表面结合的所有微粒。

【参考文献】

1. White KE, Evans WE, O'Riordan JLH, Speer MC, Econs MJ, Group 2. Lorenz-Depiereux B, Grabowski M, Mettinger T, Strom TM. "Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23". *Nat. Genet*, 2000, 26:345-8.
2. Yamashita T, Yoshioka M, Itoh N. "Identification of a Novel Fibroblast Growth Factor, FGF-23, Preferentially Expressed in the Ventrolateral Thalamic Nucleus of the Brain." *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 277:494-98.
3. White KE, Jonsson KB, Carn G, Hampson G, Spector TD, Mannstadt M, Lorenz-Depiereux B, Miyauchi A, Yang IM, Ljunggren O, Mettinger T, Strom TM, Jueppner H, Econs MJ. "The Autosomal Dominant Hypophosphatemic Rickets (ADHR) Gene Is a Secreted Polypeptide Overexpressed by Tumors that Cause Phosphate Wasting". *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2001, 86:497-500.
4. Shimada T, Mizutani S, Muto T, Yoneya T, Hino R, Takeda S, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T. "Cloning and Characterization of FGF23 As a Causative Factor of Tumorinduced Osteomalacia". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98:6500-05.
5. Strewler G. "FGF23, Hypophosphatemia, and Rickets: Has Phosphatonin Been Found?". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98:5945-46.

【生产企业】

经销商: 北京荣志海达生物科技有限公司

地址: 北京市海淀区永定路88号长银大厦12层B12室

电话: +86 10 58895646 +86 20 32293178

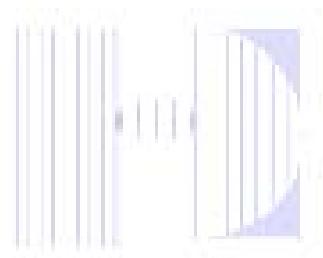
传真: +86 10 58895611 +86 20 32293177

电子邮箱: info@rz-biotech.com • 网址: www.rz-biotech.com

【医疗器械注册证书编号】

【产品标准编号】

【说明书批准及修改日期】



仅供参考, 请以原版英文说明书为准!