人巨噬细胞集落刺激因子 ELISA 试剂盒

产品编号：SEKH-0059
该试剂盒用于定量检测血清、血浆或细胞上清等样本中人 M-CSF 的浓度

仅供研究，不用于临床诊断

订购热线: 400-968-6088 * **技术支持邮箱**:service@solarbio.com
公司官网:www.solarbio.com

目　录

背景介绍 1
检测原理 1
检测原理图 2
注意事项 2
技术要点 3
试剂盒组成及储存 4
自备实验器材（不提供，可代购） 4
样本收集及储存 5
试剂准备 6
检测步骤 8
操作流程图 10
结果计算 11
典型数据 11
常见问题及解决方法 14
相关产品 15
发表优秀文献 15

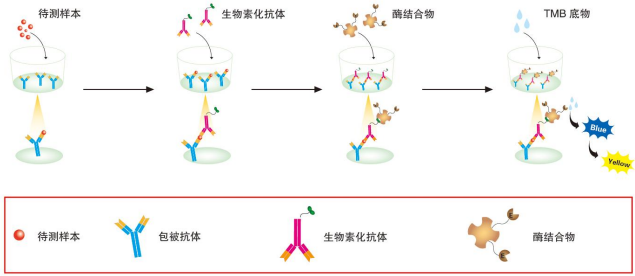
背景介绍

巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)也称为集落刺激因子-1(CSF-1),是一种具有谱系特异性的细胞因子。M-CSF 为链间二硫键连接而成的二聚体糖蛋白。M-CSF 基因定位于第 5 号染色体长臂 q23-q31，成熟的 M-CSF 是由 522 个氨基酸组成的 I 型跨膜蛋白，其中胞内区含有 464 个氨基酸，跨膜区由 21 个氨基酸组成，胞内区由 37 个氨基酸组成，分子量为 140KD。人成熟 M-CSF 前 223 个氨基酸的序列和狗、牛、小鼠和大鼠分别有 88%、86%、81%和 74%的同源性。M-CSF 主要存在于骨髓腔内，对单核细胞的增殖、分化及维持其活性有重要作用。其受体为 c-Fms。M-CSF 可在间质细胞如成纤维细胞、成骨细胞及内皮细胞中合成,也可在激活的巨噬细胞、B 细胞、T 细胞及多种肿瘤细胞中产生。M-CSF 为单核-巨噬细胞系成员,是由造血系统的单核、巨噬细胞的前体细胞融合而成。M-CSF 能促进早期多能前体细胞生长和分化为集落形成单位。促进单核细胞和粒细胞成熟，并可与红细胞生成因子（EPO）、M-CSF、G-CSF 等相互作用，促进巨核细胞生长。

检测原理

Solarbio（Solarbio®）ELISA 试剂盒采用基于双抗体夹心法的酶联免疫吸附检测技术。将抗人 M-CSF 单克隆抗体包被在酶标板上；分别加入梯度稀释的标准品和预稀释的样本，标准品和样本中的人 M-CSF 会与酶标板上的包被抗体充分结合；洗板后加入生物素化抗人 M-CSF 抗体，该抗体会与板子上包被抗体捕获的标准品和样本中的人 M-CSF 发生特异性结合；洗板后加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的链霉亲和素，生物素与链霉亲和素会发生高强度的非共价结合；洗板后加入显色剂底物 TMB，若反应孔中样品存在不同浓度的人 M-CSF，则 HRP 会使无色 TMB 变成不同深浅（正相关）的蓝色物质，加入终止液后反应孔会变成黄色；最后，在λmax=450 nm（OD=450 nm）处测定反应孔样品吸光度（OD），样本中的人 M-CSF 浓度与 OD 成正比，通过绘制标准曲线和四参数拟合软件便可计算出样本中人 M-CSF 的浓度。

检测原理图



注意事项

1. 试剂盒中的终止液为酸性溶液，操作人员在使用时请带上手套并注意防护；在操作过程中也要避免所有试剂接触皮肤和眼睛，如果不慎接触，请用大量清水清洗；检测血液样本及其它体液样本时，请按国家生物实验室安全防护有关管理规定执行。
2. 试剂盒未使用时应保存在 2~8℃冰箱在有效期内使用，已复溶但未用完的标准品应废弃或根据需要按照一次用量分装，并将其贮存在 -20～-80℃冰箱。
3. 试剂盒使用前请在室温恢复 30 min，且充分混匀试剂盒里的各种成份及制备的样品。
4. 试剂盒不能一次使用完，请在恢复室温后，将需要用的酶标板条拆下，将剩余的用封板膜贴好后放回密封袋中封好。
5. 在试验中标准品和样本建议做复孔检测，且加入试剂的顺序应保持一致。为保证结果准确，每次检测均需做标准曲线。
6. 为避免交叉污染，请在试验中使用一次性 EP 管，枪头，封板膜（※）及洁净塑料容器。
7. 浓缩酶标抗体、浓缩生物素化抗体和浓缩酶结合物的体积较少，在运

输过程中微量液体会沾到管壁及瓶盖上，使用前请离心处理（5~10 s 即可），使管壁上的液体集中在管底部，取用时，请用移液器小心吹打几次。

8. 请不要使用其他批号或其他来源试剂盒内含的试剂代替本试剂盒中的试剂。

技术要点

1. 当重溶或者混匀标准品时，应轻柔混匀，始终避免气泡产生。
2. 充分混匀对反应结果尤为重要，最好使用微量混匀器（使用低频率进行混匀）。
3. 在应用自动洗板机时，加入洗液之后，设置 10~30 秒的浸泡程序，或者在不同的洗涤步骤将微孔板掉转 180 度，这样可以提高洗板的效果。
4. 为保证结果的精确性，孵育时用封板膜封好酶标板条。
5. 显色底物在添加之前应是无色的，保持显色底物始终处于避光状态。
6. 终止液的添加顺序应与显色底物的添加顺序相同。
7. 添加终止液之后，底物的颜色应由蓝色转变为黄色。如果底物呈现绿色，说明终止液与显色底物没有充分混匀。
8. 要求样本进行预实验检测，根据实验设计进行适当的样本稀释，以确保样品值在试剂盒标曲范围内。
9. 在任何情况下，避免接触微孔板的内表面和外表面。

试剂盒组成及储存

试剂盒组成	规格（96T）	规格（48T）	保存条件
抗体预包被酶标板	8*12	8*6	**2~8℃**
标准品	2 支	1 支	**2~8℃**
SR1 标准品/样本稀释液	14 mL/瓶	7 mL/瓶	**2~8℃**
浓缩生物素化抗体	120 μL(100×)	60 μL(100×)	**2~8℃**
SR2 生物素化抗体稀释液	14 mL/瓶	7 mL/瓶	**2~8℃**
浓缩酶结合物（避光）	120 μL(100×)	60 μL(100×)	**2~8℃**
SR3 酶结合物稀释液	14 mL/瓶	7 mL/瓶	**2~8℃**
浓缩洗涤液（20×）	30 mL/瓶	15 mL/瓶	**2~8℃**
显色底物（避光）	12 mL/瓶	6 mL/瓶	**2~8℃**
终止液	10 mL/瓶	5 mL/瓶	**2~8℃**
封板胶纸	4 张	2 张	
说明书	1 份	1 份	

※注意：试剂盒应在有效期内使用，请不要使用过期的试剂
所有试剂瓶盖须旋紧以防止蒸发和微生物污染。

自备实验器材（不提供，可代购）

1. 酶标仪（主波长 450 nm，参考波长 630 nm）
2. 高精度移液器及一次性吸头：0.5~10，2~20，20~200，200~1000 μL
3. 洗板机或洗瓶
4. 双蒸水或去离子水
5. EP 管，量筒，吸水纸
6. 37℃孵育箱

样本收集及储存

血清样本：

室温血液自然凝固 30 min 后，在 4℃条件下 1000×g 离心 15 min，然后将上清等量分装于小 EP 管并于-20℃以下保存（24 小时内检测可放入 2~8℃储存），保存过程中如有沉淀，请再次离心，避免反复冻融。

血浆样本：

将全血收集到含抗血凝剂的管中，根据标本的实际要求选择 EDTA，柠檬酸钠或肝素作为抗凝剂，混合 20 min，在 4℃条件下 1000×g 离心 15 min，然后将上清等量分装于小 EP 管并于-20℃以下保存（24 小时内检测可放入 2~8℃储存），避免反复冻融。

细胞培养上清：

将细胞培养基移至无菌离心管，在 4℃条件下 1000 ×g 离心 10 min，然后将上清等量分装于小 EP 管并于-20℃以下保存（24 小时内检测可放入 2~8℃储存），避免反复冻融。

组织匀浆：

用预冷的 PBS（0.01M，pH=7.4）冲洗组织，去除残留血液，称重后将组织剪碎。将剪碎的组织与对应体积的 PBS（一般按 1:9 的重量体积比，比如 1 g 的组织样品对应 9 mL 的 PBS，具体体积可根据实验需要适当调整，并做好记录。推荐在 PBS 中加入蛋白酶抑制剂）加入玻璃匀浆器中，在冰上充分研磨。为了进一步裂解组织细胞，可以对匀浆液进行反复冻融或超声破碎。最后将匀浆液于 2~8℃，5000×g 离心 5~10 分钟，取上清检测。

※特别注意：

1.本试剂盒可能适用于其他生物样本，必须进行实验验证。

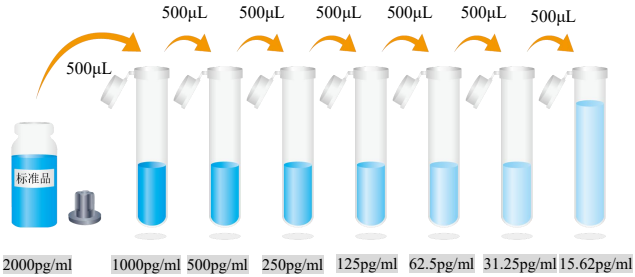
2.检测前，样本中可见的沉淀必须去除。

3.血清、血浆样本避免使用溶血、高血脂样本，以免影响检测结果。

4.如果样本中的靶标物检测浓度高于标准品的最高值，请将样品做适当倍数稀释后检测，正式实验前必须做预实验以确定稀释倍数。

试剂准备

1. **试剂回温：**在实验前 30 min 将试剂盒、待测样本放置于室温下，浓缩洗涤液如出现结晶，请放入 37℃温浴直到结晶全部溶解。
2. **配制洗涤液：**预先计算好稀释后的洗涤液使用体积，然后用双蒸水或去离子水将 20×浓缩洗涤液稀释成 1×应用液，未用完的浓缩洗涤液放入 4℃冰箱保存。
3. **标准品梯度稀释：**开盖前确保标准品所有的冻干标准品位于容器底部，加入 **SR1 标准品/样本稀释液** 1 mL 至冻干标准品中(浓度为 2000 pg/mL)，静置 10~30 min 待其完全溶解后轻轻混匀稀释前充分混匀，按照以下浓度进行 2 倍稀释：1000、500、250、125、62.5、31.25、15.62 pg/mL 进行稀释。1000 pg/mL 为标准曲线最高点浓度，**SR1 标准品/样本稀释液**作为标准曲线的 0 孔（0 pg/mL）。复溶过的标准品原液（2000 pg/mL）未用完的应废弃或根据需要按照一次用量分装，并将其贮存在-20～-80℃冰箱，标准品稀释方法具体如下图。



4. **生物素化抗体工作液：**预先计算好当次试验所需用量，用 **SR2 生物素化抗体稀释液**将 100×抗体浓缩液稀释成 1×应用工作液（稀释前充分混匀），请在 30 min 内加入到反应孔中。生物素化抗体工作液具体稀释方法如下：

板条	浓缩生物素化抗体（100×）：μL	检测稀释液（SR2）：μL
2	20	1980
4	40	3960
6	60	5940
8	80	7920
10	100	9900
12	120	11880

5. **酶结合物工作液：**预先计算好当次试验所需用量，用 **SR3 酶结合物稀释液**将 100×浓缩酶结合物稀释成 1×应用工作液（稀释前充分混匀），请在 30 min 内使用。酶结合物工作液具体稀释方法如下：

板条	浓缩酶结合物（100×）：μL	检测稀释液（SR3）：μL
2	20	1980
4	40	3960
6	60	5940
8	80	7920
10	100	9900
12	120	11880

6. **洗涤方法：**

- 自动洗板：甩尽酶标板孔中液体，在厚迭吸水纸上拍干，注入洗涤液为 300 μL/孔，注入与吸出间隔为 30 秒，按检测步骤中的洗板次数，重复此洗板步骤。
- 手工洗板：甩尽酶标板孔中液体，在厚迭吸水纸上拍干，用洗瓶加入洗涤液 300 μL/孔，静置 30 秒后甩净酶标板孔中液体，在厚迭的吸水纸上拍干，按检测步骤中的洗板次数，重复此洗板步骤。

检测步骤

检测之前请将所有的试剂、样本平衡至室温。

1. 准备好所有需要的试剂及工作浓度的标准品。
2. 分别设定标准孔、0 孔和样本孔，**计算好当次试验所需要的板条数量，将不需要的板条拆卸下来，用新的封板膜重新封好，放回装有干燥剂的铝箔袋。**
3. 浸泡酶标板：加入 300 μL 1×洗涤液静置浸泡 30 秒，弃掉洗涤液之后，在吸水纸上将微孔板拍干，重复 2 次。

提示：洗板完成之后，请立即使用微孔板，不要让微孔板干燥。

4. 加标准品：标准品孔加入 100 μL 的 2 倍倍比稀释的标准品。0 孔加入 100 μL 标准品/样本稀释液。
5. 加样本：样本孔加入 100 μL 的待测样本。保证步骤 4、5 连续加样，不要间断。加样过程在 10 min 内完成。
6. 孵育：使用新的封板膜封板。37℃静置孵育 90 min。
7. 洗涤：弃掉液体，每孔加入 300 μL 洗液洗板，洗涤 4 次。每次洗板，在吸水纸上拍干。

提示：为获得理想的实验结果，必须彻底移除残留液体。洗板完成之后，请立即进行下步操作，不要让微孔板干燥。

8. 加生物素化检测抗体：加入 100 μL 生物素化抗体工作液至反应孔中。
9. 孵育：使用新的封板膜封板。37℃静置孵育 60 min。
10. 洗涤：弃掉液体，每孔加入 300 μL 洗液洗板，洗涤 4 次。每次洗板，在吸水纸上拍干。

提示：为获得理想的实验结果，必须彻底移除残留液体。洗板完成之后，请立即进行下步操作，不要让微孔板干燥。

11. 加酶结合物：加入 100 μL 酶结合物工作液至反应孔中。
12. 孵育：使用新的封板膜封板。封板后于 37℃静置孵育 30 min。
13. 洗涤：弃掉液体，每孔加入 300 μL 洗液洗板，洗涤 5 次。每次洗板，在吸水纸上拍干。

提示：为获得理想的实验结果，必须彻底移除残留液体。洗板完成之后，请立即进行下步操作，不要让微孔板干燥。

14. 加底物显色：每孔加入 100 μL 显色底物 TMB，避光，37℃避光显色 15 min。

提示:可根据实际显色情况酌情缩短或延长显色时间,但不可超过 30 min。当标准孔颜色出现明显梯度时（标准孔的前 4 孔出现明显的蓝色梯度，后 3~4 孔不明显），即可终止。提前 15 min 打开酶标仪预热。

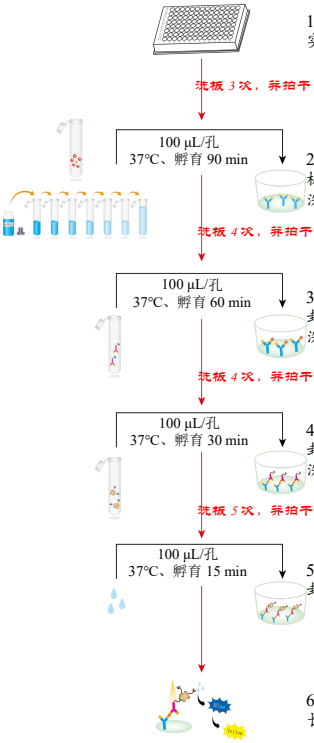
15. 加终止液：每孔加入 50 μL 终止液，终止液加入的顺序应尽量与显色底物加入的顺序相同。

提示：终止液加入后微孔板内液体的颜色由蓝色变为黄色。如果颜色呈现绿色或者颜色的变化明显不均匀，请轻轻叩击板框，水平充分混匀。

16. 检测读数：在 5 min 之内，使用酶标仪进行双波长检测，测定 450 nm 最大吸收波长和 630 nm 参考波长下的 OD 值。

提示：校准后的 OD 值为 450 nm 的测定值减去 630 nm 的测定值。（注：630 nm OD 值为酶标板材质吸收值。若不能进行双波长检测，可只测定 450 nm 波长下的 OD 值，但数据的准确度会降低一些）

操作流程图



※特别说明：振荡孵育转速控制在 100-300 r/min，显色时间需要根据实际显色情况酌情缩短或延长，但不可超过 30 min。当标准孔蓝色出现明显梯度时候（标准孔前 4 孔蓝色明显，后 4 孔蓝色不明显），即可终止。

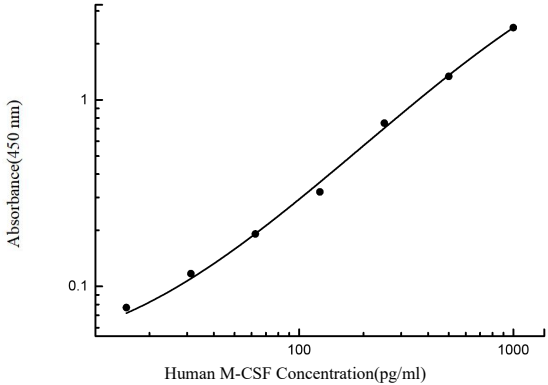
结果计算

1. 推荐使用酶标仪进行双波长检测，测定 450 nm 和 630 nm 波长下的 OD 值，并用 450 nm 的 OD 测定值减去 630 nm 的 OD 测定值。
2. 计算标准品、样品的平均 OD 值：每个标准品和样品的 OD 值应减去 0 孔的 OD 值。
3. 以标准品浓度为横坐标，吸光度 OD 值为纵坐标，用 Excel 或 ELISA Calc 软件绘制标准曲线（推荐使用四参数拟合），样品中人 M-CSF 含量可通过对应 OD 值由标准曲线换算出相应的浓度。（**相关软件及详细操作方法，如有疑问可联系公司技术支持**）
4. 通过对浓度值和 OD 值取对数拟合，可以对标准曲线进行线性化。此过程可能可以得到更多样本的浓度，但数据的准确度会降低一些。
5. 如果样本进行了稀释，计算样本浓度时请乘以相应的稀释倍数。
6. 若样本 OD 值高于标准曲线上限，应做适当稀释后重新检测，计算浓度时再乘以稀释倍数。

典型数据

1. **数据和标准曲线**

标准品浓度(pg/mL)	OD值1	OD值2	平均值	矫正值
1000	2.375	2.509	2.442	2.399
500	1.344	1.332	1.338	1.295
250	0.743	0.759	0.751	0.708
125	0.311	0.331	0.321	0.278
62.5	0.195	0.187	0.191	0.148
31.25	0.116	0.118	0.117	0.074
15.625	0.085	0.069	0.077	0.034
0	0.039	0.047	0.043	-



每次检测，每块酶标板都必须设立标准曲线，本图仅作为示例参考，应以当次试验标准品绘制的标准曲线计算人 M-CSF 的样本含量。

2. 灵敏度

最低可检测人 M-CSF 浓度达 7 pg/ml，20 个零标准品浓度 OD 的平均值加上两个标准差，计算相应的可检测浓度。

3. 特异性

不与人 G-CSF、人 GM-CSF、人 HB-EGF、人 FGF-6、人 FGF-9、人 FGF-10、人 FGF-18、人 FGF acidic、小鼠 G-CSF、小鼠 GM-CSF、小鼠 M-CSF R、小鼠 VEGF120、小鼠 VEGF164、小鼠 PDGF-CC、小鼠 PDGF Rα等反应。

4. 重复性

板内，板间变异系数<10%。

5. 加标回收率

在选取的健康人血浆、细胞培养上清中加入 3 个不同浓度水平的人 M-CSF，计算回收率。

样本类型	平均回收率（%）	范围（%）
血浆	99	89-111
细胞培养上清	95	82-105

6. 线性稀释

分别在选取的 4 份健康人血浆和细胞培养上清中加入高浓度人 M-CSF，在标准曲线动力学范围内进行稀释，评估线性。

稀释比例	回收率(%)	血浆	细胞培养上清
1:2	平均回收率（%）	101	99
	范围(%)	94-115	92-108
1:4	平均回收率（%）	100	100
	范围(%)	91-112	93-108

常见问题及解决方法

问题	可能原因	解决方法
高背景或阴性对照值偏高	洗板不充分	将洗涤液注入反应孔充分洗涤，彻底拍干孔中液体
	酶结合物过量	检查酶稀释度，按说明书标识的稀释度稀释
	底物污染	加底物前检查底物是否为透明无色，请勿用变蓝的底物，重新用新的底物试验
	阴性对照孔被阳性对照污染	注意洗涤时不要把洗液溢出孔外，不使阴阳对照孔液体涟接一起
	不同批次试剂混用	检查试剂批号，请勿用不同批次试剂
显色信号弱	试剂过期	检查试剂盒有效期，请勿用过期试剂
	孵育时间过短	按说明书中规定的时间孵育
	试剂污染	检查试剂是否污染，请勿用污染的试剂
	酶标仪滤光片不匹配	检查酶标仪设置及滤光片是否匹配
	试剂盒平衡不充分	确保试剂盒试验前平衡至室温
	显色时间不够	增加底物显色时间
无显色信号	检测抗体、酶、或显色剂漏加	检查试验操作流程，重复试验
	酶被叠氮钠污染	请使用重新配制的试剂
	试剂添加顺序有误	检查复核试验添加顺序、流程，重复试验
标曲佳但样品孔无信号	样品中靶标物含量低或样品中无靶标物	设置阳性对照，重复实验
	样品基质效应影响检测	重新稀释样品后复测
标曲佳但样品信号偏高	样品中待检物含量超过标准曲线范围	重新稀释样品后复测
边缘效应	孵育温度不均衡	孵育时每步均使用新的封板胶纸，避免在环境温度变化大的地方孵育，勿叠放反应板

相关产品

产品名称	货号	规格	推荐等级
ELISA 套装(含 ELISA 通用稀释液/TMB 底物/浓缩洗涤液/终止液/封板胶纸/封闭液/包被液)	SEKF105	96T	★★★★★
无菌去离子水	F0020	100mL，500mL	★★★★
Human IL-1β ELISA KIT	SEKH-0002	48T，96T	★★★★★
Human IL-6 ELISA KIT	SEKH-0013	48T，96T	★★★★★
Human IL-12 p70 ELISA KIT	SEKH-0021	48T，96T	★★★★★
Human IFN-γ ELISA KIT	SEKH-0046	48T，96T	★★★★★
Human TNF-α ELISA KIT	SEKH-0047	48T，96T	★★★★★

发表优秀文献

[1] Zu M, Xie D, Canup B S B, et al. ‘Green’nanotherapeutics from tea leaves for orally targeted prevention and alleviation of colon diseases[J]. Biomaterials, 2021, 279: 121178.(IF12.4)

[2] Zhao D, Shao H. Effect of blood purification on serum miR-126 and VEGF levels in the process of atherosclerosis in uremic patients under maintenance hemodialysis[J]. The Kaohsiung Journal of Medical Sciences, 2018, 34(8): 447-455.(IF1.291)

[3] Jiang S, Zhao G, Lu J, et al. Silencing of circular RNA ANRIL attenuates oxygen‐glucose deprivation and reoxygenation-induced injury

in human brain microvascular endothelial cells by sponging miR-622[J]. Biological Research, 2020, 53(1): 1-12.(IF3.092)

[4] Qian L, Yang F, Lin X, et al. Pyrroloquinoline quinone ameliorates liver injury in mice induced by cyclophosphamide[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2022, 29(20): 30383-30393.(IF5.12)

[5] Lv Y, Li F, Wang S, et al. Near-infrared light‐triggered platelet arsenal for combined photothermal-immunotherapy against cancer[J]. Science Advances, 2021, 7(13): eabd7614.(IF13.116)

如需其他试剂盒组分或试剂盒，请联系北京索莱宝科技有限公司！！！