

Elisa试剂盒使用说明书

HMGB-1 ELISA Kit

全国统一热线：400-600-4213
www.biosharp.cn

本试剂盒用于体外定量检测人/小鼠/大鼠/猪/牛/狗等血清、血浆中的高迁移率族蛋白1浓度。使用前请仔细阅读说明书并检查试剂组分，如有任何疑问请与合肥兰杰柯科技有限公司联系，公司将为您提供强有力的技术支持。

目录

一、产品简介	2
二、检测原理	2
三、试剂盒组分	3
四、储存条件	3
五、注意事项	3
六、实验过程需自备的仪器与材料	3
七、使用说明	4
7.1 样品处理及保存方法	4
7.2 试剂准备	4
7.3 操作步骤	4
7.4 操作要点提示	5
7.5 结果判断	5
八、常见问题分析及解决	6

HMGB-1 (高迁移率族蛋白 1) ELISA KIT

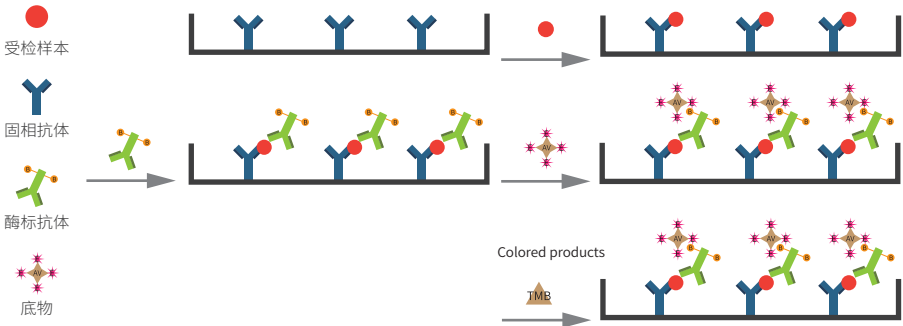
货号	名称	规格
BQEN-570-96T	HMGB-1 (高迁移率族蛋白 1) ELISA KIT	96T

一、产品简介

高迁移率族蛋白 1(High Mobility Group-box 1 protein, HMGB-1),是 HMGB家族三个蛋白中的一种,这三个蛋白分别是 HMGB1、HMGB2和HMGB3。HMGB1蛋白是一个高度保守性的蛋白,在小鼠、大鼠、牛、犬和猪等种属中有99%的同源性。HMGB1是一种细胞内蛋白,它可以转移到细胞核,在细胞核内结合DNA并调控基因表达,与DNA结合的HMGB1通常含有特定的二级结构,如超螺旋、十字结构和转角结构等。HMGB1也可与多种转录因子相互作用,支持多种基因的转录,它还可与核小体相互作用。HMGB1 蛋白由3个独特的结构域组成。其中 A-box 位于N-末端,进化高度保守;C-tail 在羧基末端,包含30个重复的天冬氨酸和谷氨酸残基,可参与调节HMGB1与DNA结合的亲和力;B-box 位于二者之间。A-box和B-box 均由3个 α 螺旋组成,并带有强烈的正电荷,构成HMGB1的非特异性DNA结合区。研究发现,感染和炎症进程中,活化的单核巨噬细胞或坏死细胞等可以释放大量的HMGB1,可通过TLR4等受体诱导产生TNF- α 和IL-6等促炎症因子。另外,细胞外的HMGB1可以通过与其受体结合,主要通过晚期糖基化终末产物受体(RAGE)结合,从而刺激其他细胞产生相应的复杂生物学效应,包括炎症反应、神经生长以及细胞的增殖、分化、迁移等。同时, HMGB1广泛地参与了肿瘤的发生、生长、浸润及转移等过程。

二、检测原理

本实验采用双抗体夹心ELISA 法检测样本中高迁移率族蛋白1的浓度。用 抗高迁移率族蛋白1单克隆抗体预包被酶标板,加入适度稀释的样本和标准品,其中的高迁移率族蛋白1会与其单抗结合,洗去游离成分;加入辣根过氧化物酶标记的抗高迁移率族蛋白1抗体,抗高迁移率族蛋白1抗体与高迁移率族蛋白1特异性结合,形成夹心的免疫复合物,洗去未结合的酶结合物;加入显色剂,若反应孔中有高迁移率族蛋白1,辣根过氧化物酶会使无色的显色剂现蓝色;加终止液变黄。在450nm下测OD值,高迁移率族蛋白1浓度与OD₄₅₀值之间呈正比,可通过绘制标准曲线计算出标本中高迁移率族蛋白1浓度。



三、试剂盒组成

组分编号	组分	96T	储存条件
BQEN-570-1	高迁移率族蛋白 1 标准品	2 支(冻干)	-20°C
BQEN-570-2	标准品稀释液	10ml	2-8°C
BQEN-570-3	高迁移率族蛋白 1 预包被板	12 条	2-8°C
BQEN-570-4	高迁移率族蛋白 1 抗体 HRP 结合物	10ml	2-8°C
BQEN-570-5	浓缩洗涤液 20×	30ml	2-8°C
BQEN-570-6	TMB 底物	10mL	2-8°C
BQEN-570-7	终止液	5mL	2-8°C
BQEN-570-8	封板胶纸	3张	2-8°C
	说明书	1份	

四、储存条件

产品收到后如果不立即使用,请根据提示将不同的组分放到对应的储存条件储存(冻干标准品-20°C保存,其它组分2-8°C保存)。试剂盒有效期 6 个月,酶标板拆开后建议一个月内使用完毕。

五、注意事项

- 1、试剂盒保存在2-8°C,除复溶后的标准品,其它成分不可冷冻。
- 2、由于标准品一般是冻干粉,在制备后需要严格校准,所以标准品的瓶数及每瓶标准品所需加入的稀释液体积请以实际收到的试剂盒及标准品标签上的标注为准。
- 3、浓缩洗涤液因在低温下可能有结晶,请水浴加热使结晶完全溶解后再配制工作液。
- 4、标准品复溶加样后,为了确保标准品使用的准确性,如有剩余请丢弃避免再次使用。
- 5、TMB溶液请勿接触氧化剂和金属,避免失效。
- 6、不同批号试剂不可混用。
- 7、为避免交叉污染请使用一次性吸头。
- 8、洗涤过程是至关重要的,洗涤不充分会使精确度下降并导致结果误差较大,请严格按照说明书的洗涤次数和浸泡时间进行洗涤(机器洗板按设定的程序洗板,人工洗板浸泡时间可适当延长)。
- 9、在试验中标准品和样本检测时建议作双复孔或三复孔,加入试剂的顺序应一致,以保证所有反应孔孵育的时间一样。
- 10、加样过程中避免气泡的产生。
- 11、本产品仅限于专业人员的科学研究用,不得用于临床诊断或治疗,不得用于食品或药品,不得存放于普通住宅内。
- 12、为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作。

六、实验过程需自备的仪器与材料

- 1、酶标仪(450nm)
- 2、高精度可调移液器及吸头:0.5-10, 2-20, 20-200, 200-1000 μ L;一次检测 样品较多时,最好用多通道移液器
- 3、自动洗板机或洗瓶
- 4、双蒸水或去离子水

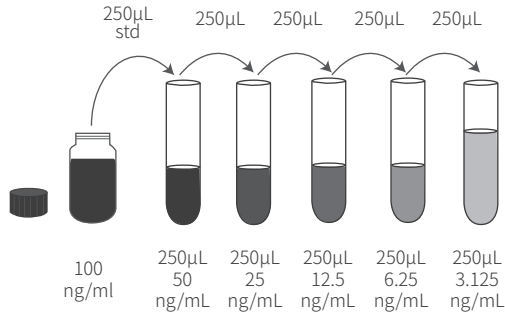
七、使用说明

7.1 样品处理及保存方法

1. 血清:血清样本收集时, 请注意不同样本凝血时间尽可能保持一致。
2. 血浆:血浆样本收集时, 如果不能及时离心, 需添加抗凝剂, 建议尽量用 EDTA 抗凝剂。
3. 细胞上清液:1000×g 离心10min去除颗粒和聚合物。
4. 保存:若样品不立即检测, 请将其按一次用量分装, -20°C保存, 避免反复冻融。如果血清中含有大量颗粒, 检测前先离心或过滤去除;室温下解冻, 请勿于37°C或更高的温度加热解冻。
5. 请勿使用溶血, 高血脂或污染的标本检测, 否则结果将不准确。
6. 样本的稀释:血清或血浆样本建议从2倍开始稀释。

7.2 试剂准备

1. 提前 30min 从冰箱中取出试剂盒, 平衡至室温 (25~28°C)。
2. 洗涤缓冲液:从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶, 这属于正常现象, 加热并轻轻摇晃使结晶完全溶解后再配制。将浓缩洗涤液用双蒸水稀释(1:20)。未用完的放回 4°C。
3. 标准品:按标签复溶体积加入标准品稀释液(无需稀释)复溶使HMGB-1终浓度达到 100ng/mL, 室温反应, 请严格控制 在25~28°C, 静置10~15分钟后轻轻混悬(建议抽吸几次)待彻底溶解, 用标准品稀释液倍比梯度稀释后依次加入检测孔中, 见下图(建议标准曲线使用以下浓度:100、50、25、12.5、6.25、3.125、0ng/mL, 标准品稀释液直接加入检测孔中作为 0 浓度)。稀释的标准品不得重复使用。



标准品稀释方法

7.3 操作步骤

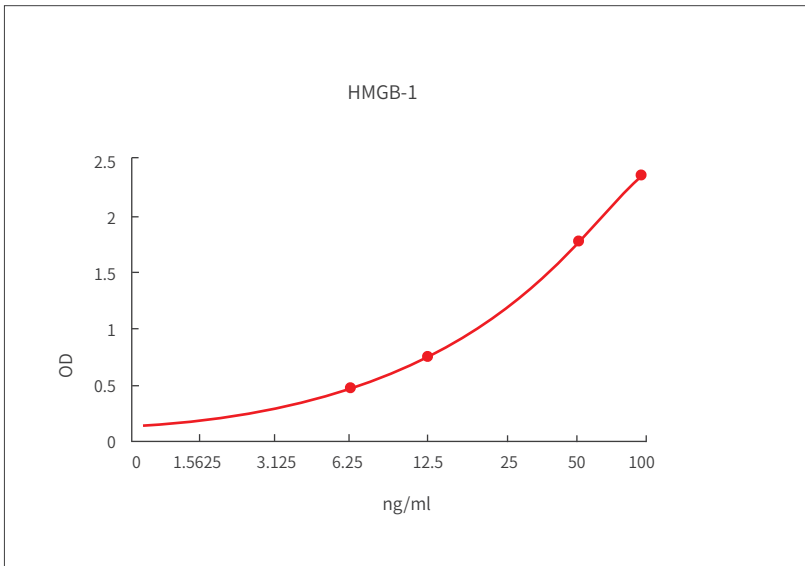
1. 按照上述准备工作配制好各种溶液。
2. 根据需要取所需的板条数, 可以设置空白对照孔, 方法为该孔只加 TMB 显色液和中止液。
3. 分别将稀释好的样品或不同浓度标准品 (100µL/孔) 加入相应孔中 (零孔只加标准品稀释液), 用封板胶纸封住反应孔, 室温 (25~28°C) 孵育 120 分钟 (空白对照孔除外)。
4. 洗板 5 次: (1) 自动洗板机: 要求注入的洗涤液为每孔 300µL, 注入与吸出间隔 15-30 秒。(2) 手工洗板: 每孔加洗涤液 300µL, 静置 30 秒后用尽液体。最后一次洗板完成后将板倒扣在厚吸水纸上用力拍干。
5. 每孔加入抗体 HRP 酶结合物工作液 (100µL/孔), 用封板胶纸封住反应孔, 室温 (25~28°C) 孵育 60 分钟。
6. 洗板 5 次, 且最后一次置厚吸水纸上拍干。
7. 加入显色剂 TMB 100µL/孔, 避光, 室温 (25~28°C) 孵育 15-20 分钟。
8. 加入终止液 50µL/孔, 混匀后及时测量 OD₄₅₀ 值。

7.4 操作要点提示

1. 配制各种试剂时要充分混匀,但要避免产生大量泡沫,以免加样时加入大量的气泡,产生加样误差。
2. 为避免交叉污染,在加入不同浓度的标准品、不同样品、不同试剂时谨记及时更换吸头。
3. 为了确保准确的结果,在每次孵育前均需使用新封板胶纸封住反应孔。
4. 显色剂在添加之前,应保持无色,请勿使用已变为蓝色的显色溶液。最佳显色时间对标准曲线很重要,肉眼可见前3-4孔有梯度蓝色,后3-4孔差别不明显,零孔无蓝色出现即可终止。
5. 每次检测均要做标准曲线,根据样品待测因子的含量,适当稀释或浓缩样本,最好做预实验。

7.5 结果判断

1. 如果做了空白对照组,将每个孔的OD值减去空白孔的OD值,复孔的值在20%的差异范围内结果才有效。
2. 可根据使用习惯及实验室建立的模型,使用计算机软件计算相应的样本浓度。也可用EXCEL软件,将标准品的浓度放X轴,OD值放Y轴,拟合曲线,计算样本结果。
3. 若标本OD值高于标准曲线上限,应适当稀释后重测,计算浓度时应乘以稀释倍数算标本含量。



注:本图仅供参考,应以同次试验标准品所绘标准曲线为准。

结果重复性:

板间,板内变异系数均<10%。

灵敏度

多次重复结果表明,最小检出量为0.8ng/mL。最低检出量测定方法:20个零标准的平均OD值增加两个标准差,再计算相应的浓度。

特异性

与HMGB-2蛋白有12.7%的交叉反应。

八、常见问题分析及解决

问题	可能原因	解决办法	
无颜色	不同试剂盒或不同批号的试剂混合	重新检查试剂的标签, 确保所有组分都属于正使用的试剂盒中的。不能混用不同试剂盒或不同批号的试剂。	
	漏加酶	检查操作流程, 注意不要漏加	
	HRP酶污染了叠氮钠	使用新配制的试剂, 禁止叠氮钠	
	试剂配制/使用有误	重做试验, 严格按说明书操作, 每次配制和使用前看清标签	
显色弱	超过有效期的产品可能会产生很弱的信号	检查产品有效期	
	缩短孵育时间会使实验信号变弱	检查孵育时间	
	使用了被污染的试剂	检查试剂是否被污染	
	仪器设定不正确, 滤光片不匹配	仪器是否设定正确, 滤光片的使用等	
	洗涤操作不规范	洗涤不充分, 使用手工洗板常出现	洗瓶洗涤, 每孔应完全充满洗涤缓冲液, 倾出时应迅速
			若用洗板机, 应校准并设定足够充满每孔的体积量。板内侧不应接触设备
		检查每孔是否有残留的洗液或每孔加样量的体积是否准确	
		可在两次洗板之间加30秒的浸泡	
高背景	实验中孵育温度和时间不适当	确定每一试验步骤的孵育温度和时间是否适当	
	酶加量过多	加酶前查看移液器调节量是否准确 检查稀释度, 若必要进行效价测定	
全部板子变成规则的蓝色	不充分的洗涤/洗涤步骤被遗漏使没结合的HRP仍有残留	最好使用洗板机充分洗涤 检查每孔是否有残留的洗液或加样量是否准确	
	太多的酶结合物	检查稀释度, 必要时进行效价测定	
高CV值花板	封板膜或试剂容器被重复使用, 导致HRP残留, 使TMB底物产生非特异蓝色	使用新封板膜, 每步使用不同的试剂容器	
	操作不慎或洗涤不充分	按说明书洗板、加样和显色, 洗板尤为重要	
	出现干板, 没有使用封板膜、封板膜重复使用	确定每两步骤间酶板应保持湿润 使用封板膜封口, 注意每步使用新鲜的封板膜	
标准曲线可得到, 但两点之间区别很差 (低或平的曲线)	移液器不准确, 吸头重复使用	检查并校准移液器, 每次取样必须更换吸头	
	酶结合物不足	检查稀释度, 必要时进行效价测定	
	检测抗体不足	检查稀释度, 必要时进行效价测定	
	板子显色不足	延长底物孵育时间 使用推荐品牌的底物溶液	
标准曲线很好, 但没有任何期望的阳性信号	标本中无相应的待检测物质	使用内参对照	
	标本基质遮盖检测	重复实验, 重新考虑实验的相应参数 将标本至少做1:2相应的稀释, 或进行系列稀释	
标准曲线很好, 但标本的判读值很高	标本中含的待检物质水平超过实验范围	稀释标本	
边缘效应	工作环境温度不均衡	避免将板子在变化温度环境中孵育	
	实验过程中出现间断	整个实验应连续操作, 在实验开始前将所有的标准品和标本做适当的准备。	
漂移	试剂没有按说明书平衡至室温	在所有试剂加入孔前, 确保它们已平衡至室温, 除非说明书中有另外的要求。	
	是否可更改试剂盒所提供的操作步骤?	一般厂商为确保最高的灵敏度, 对试剂盒都进行了优化, 为确保每一试剂盒实验的规范性应按说明书操作。	
	是否可混用不同批次试剂盒中的试剂?	不可以, 绝大多数试剂在每批试剂盒中是特异的, 若有问题可与厂家或代理商联系。	
	是否可增加或减少标本的体积?	商品化的试剂盒所需加入的标本体积是优化的, 应按说明书操作, 不建议更改所加标本体积。	
	是否可重新确定自己的标准曲线的点?	可以。说明书上有建议制备标准曲线时标准品的稀释度, 可改变稀释倍数和增加曲线的点, 但是必须在实验范围内, 高于试剂盒中最高标准品的点和低于灵敏度以下的点是无效的。	

