

## 人BAG3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: KE00392  
规格: 96T  
灵敏度: 12.6 pg/mL  
检测范围: 125-8000 pg/mL  
用途: 此试剂盒用于定量检测血浆以及细胞裂解液中的人BAG3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     | 8 |
| 9.7 特异性    | 9 |
| 十：参考文献     | 9 |

## 一：背景信息

BAG3 (Bcl2-associated athanogene 3) 属于BAG蛋白家族, 是通过BAG结构域结合Hsc70/Hsp70并调节其多肽折叠活性的共伴侣蛋白。BAG3还含有一个WW结构域和一个富含脯氨酸(PXXP)的重复序列, 介导与不同于Hsp70的伴侣的结合。BAG3通过与不同的分子伴侣相互作用, 影响细胞凋亡、自噬和细胞运动等多种细胞过程。据报道, BAG3蛋白在几种肿瘤类型中有维持细胞存活、抵抗治疗、和/或运动和转移的作用, 因此被确定为抗癌治疗的潜在靶点。

## 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 *             | 16000 pg/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 (用于人血浆样本)     | 30 mL/瓶    | 1 瓶 |
| Sample Diluent PT 4B1                     | 样本稀释液 PT 4B1 (用于细胞裂解液样本) | 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 |
| Extraction Reagent                        | 裂解液                      | 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）。
- 6.2 细胞裂解液：收集细胞后，用预冷(2-8℃)的1×PBS洗3次，500×g离心5 min。细胞计数，离心弃上清；加PMSF至细胞裂解液中，终浓度为1 mM；按每1×10<sup>7</sup>个细胞，加入1 mL细胞裂解液(含PMSF)，冰上裂解30 min，其间上下颠倒使裂解更充分，超声波破碎处理，8000×g-10000×g离心5 min，分离上清，分装后-80℃存放，并用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定总蛋白浓度，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℃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。

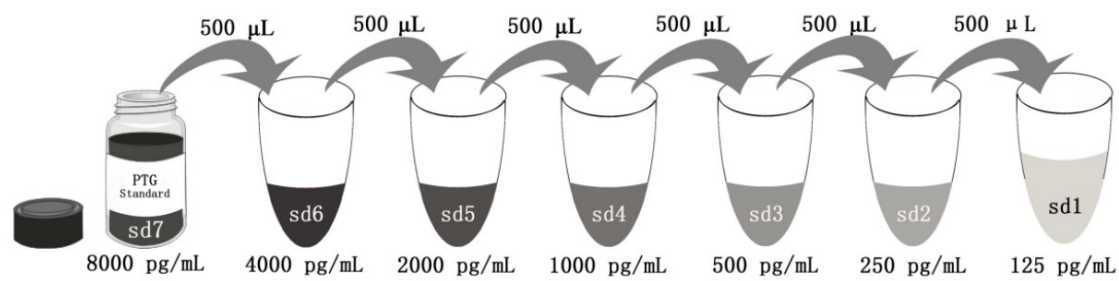
7.3 待检测样本：

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：人血浆和细胞裂解液样本1:2或1:4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：

检测人血浆样本，用2 mL PT 1样本稀释液复溶标准品；检测细胞裂解液样本，用2 mL PT 4B1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 or PT 4B1             | 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20-30min（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；

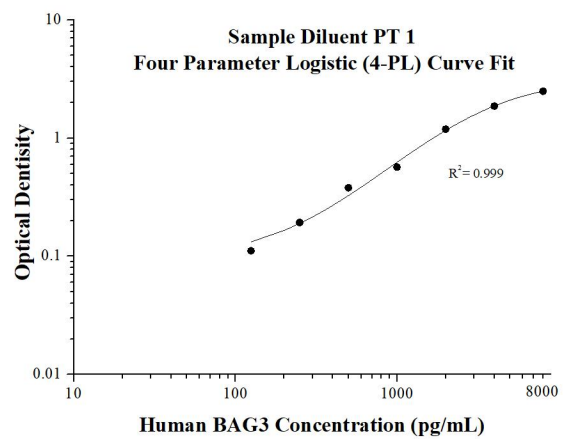
8.10 数据分析：每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD值为纵坐标，使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

操作流程如下：

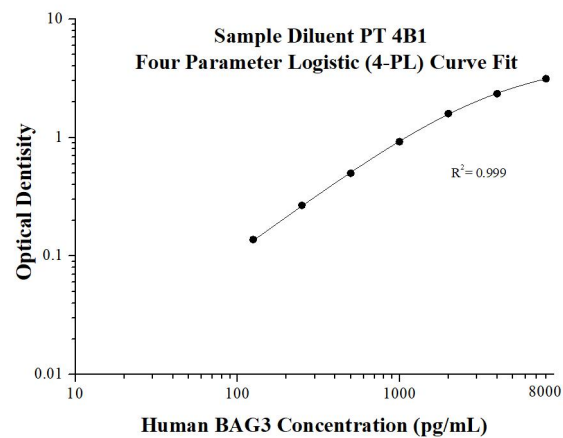
| 步骤 | 试剂                                           | 体积          | 孵育时间     | 洗涤次数  | 孵育温度         |
|----|----------------------------------------------|-------------|----------|-------|--------------|
| 1  | 标准品或样本                                       | 100 $\mu$ L | 120 分钟   | 4 次   | 覆膜后37°C孵育    |
| 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



| (pg/mL) | O.D              | Average | Corrected |
|---------|------------------|---------|-----------|
| 0       | 0.0743<br>0.0706 | 0.07245 | -         |
| 125     | 0.1877<br>0.1795 | 0.1836  | 0.11115   |
| 250     | 0.2723<br>0.2586 | 0.26545 | 0.193     |
| 500     | 0.4657<br>0.4387 | 0.4522  | 0.37975   |
| 1000    | 0.5388<br>0.7406 | 0.6397  | 0.56725   |
| 2000    | 1.284<br>1.2367  | 1.26035 | 1.1879    |
| 4000    | 1.9886<br>1.8865 | 1.93755 | 1.8651    |
| 8000    | 2.5643<br>2.5702 | 2.56725 | 2.4948    |



| (pg/mL) | O.D              | Average | Corrected |
|---------|------------------|---------|-----------|
| 0       | 0.1004<br>0.1073 | 0.10385 | -         |
| 125     | 0.2403<br>0.2424 | 0.24135 | 0.1375    |
| 250     | 0.3733<br>0.3703 | 0.3718  | 0.26795   |
| 500     | 0.5869<br>0.6187 | 0.6028  | 0.49895   |
| 1000    | 1.0004<br>1.0503 | 1.02535 | 0.9215    |
| 2000    | 1.759<br>1.636   | 1.6975  | 1.59365   |
| 4000    | 2.501<br>2.3929  | 2.44695 | 2.3431    |
| 8000    | 3.2808<br>3.1906 | 3.2357  | 3.13185   |

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 (pg/mL) | 标准差   | 变异系数CV% |
| 1           | 20 | 3,765.1     | 134.7 | 3.6     |
| 2           | 20 | 965.1       | 22.2  | 2.3     |
| 3           | 20 | 246.4       | 8.4   | 3.4     |

| 板间精密度 (CV 间) |    |             |       |         |
|--------------|----|-------------|-------|---------|
| 样本           | 数量 | 平均值 (pg/mL) | 标准差   | 变异系数CV% |
| 1            | 24 | 4,095.2     | 285.9 | 7.0     |
| 2            | 24 | 1,031.8     | 49.6  | 4.8     |
| 3            | 24 | 268.8       | 13.8  | 5.1     |

## 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BAG3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 (%)  |
|-------|------|---------|---------|
| 人血浆   | 1:2  | 101     | 94-107  |
|       | 1:4  | 94      | 93-96   |
| 细胞裂解液 | 1:16 | 112     | 109-114 |

## 9.4 样本值

人血浆 - 应用本试剂盒，检测人血浆样本中人BAG3的浓度。

| 样本类型         | 均值 (pg/mL) | 范围 (pg/mL)   |
|--------------|------------|--------------|
| 人血浆样本 (n=16) | 1332.2     | 324.4-7946.1 |

### 细胞裂解液

|               | 人BAG3 (pg/mL) | 总蛋白量 (mg/mL) |
|---------------|---------------|--------------|
| HEK-293T细胞裂解液 | 5853.6        | 1.4          |

## 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BAG3的灵敏度为12.6 pg/mL。

## 9.6 线性

人血浆加入高浓度的人BAG3蛋白，梯度稀释后检测样本加标线性，细胞裂解液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：

|      |        | 人血浆<br>(样本稀释液 PT 1) | 细胞裂解液<br>(样本稀释液 PT 4B1) |
|------|--------|---------------------|-------------------------|
| 1:2  | 均值 (%) | 105                 | 100                     |
|      | 范围 (%) | 99-111              | -                       |
| 1:4  | 均值 (%) | 111                 | 87                      |
|      | 范围 (%) | 110-112             | 86-87                   |
| 1:8  | 均值 (%) | 104                 | 90                      |
|      | 范围 (%) | 103-106             | 84-96                   |
| 1:16 | 均值 (%) | 111                 | 100                     |
|      | 范围 (%) | 109-113             | 94-107                  |

## 9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人BAG3，加入50 ng/mL以下细胞因子，无明显交叉反应。

Human:

NEDD4L

## 十：参考文献

1. Michael Y Sherman, Vladimir Gabai. (2022). J Cell Biochem. 123(1):43-53.
2. Xia Liu, et al. (2023). Stroke. 54(8):2114-2125.
3. Liberato Marzullo, et al. (2020). Biochim Biophys Acta Gen Subj. 1864(8):129628.
4. Jennifer N Rauch, et al. (2016). J Biol Chem. 16;291(38):19848-57.