

人/小鼠HMGB1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: KE00343
规格: 96T
灵敏度: 0.04 ng/mL
检测范围: 0.156-10 ng/mL
用途: 此试剂盒用于定量检测血清和血浆中的人/小鼠HMGB1浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

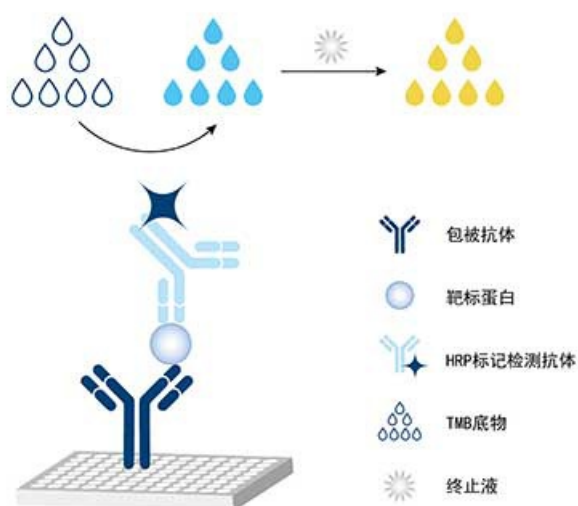
目录

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	7
9.4 样本值	8
9.5 灵敏度	8
9.6 线性	8
9.7 特异性	8
十：参考文献	9

一：背景信息

HMG（高迁移率族）蛋白是一种非组蛋白染色体蛋白，存在于几乎所有真核细胞中，其功能是稳定核小体的形成，并且具有类似转录因子蛋白的功能，调节一些基因的表达。HMGB1是一种重要的细胞因子，一旦受到损伤、感染或其他炎症刺激，激活的巨噬细胞、成熟的树突状细胞和自然杀伤细胞就会分泌 HMGB1。HMGB1还参与 V(D)J 重组，充当 RAG 复合物的辅因子，刺激保守重组信号序列 (RSS) 23 bp 间隔处的剪切。作为肝素结合蛋白，HMGB1在发育细胞中确保细胞朝着特定的方向发育和成熟。HMGB1（高迁移率族蛋白1）调节细胞核内的基因表达，但某些免疫细胞会分泌 HMGB1作为细胞外警报素，以发出组织损伤信号。在培养和体内衰老的人类和小鼠细胞中，细胞核 HMGB1 会重新定位到细胞外环境，从而通过TLR-4信号刺激细胞因子分泌。

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 *	40 ng/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 3B1	样本稀释液 PT 3B1	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
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×）：

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 990μL 抗体稀释液进行配制，轻轻混匀。

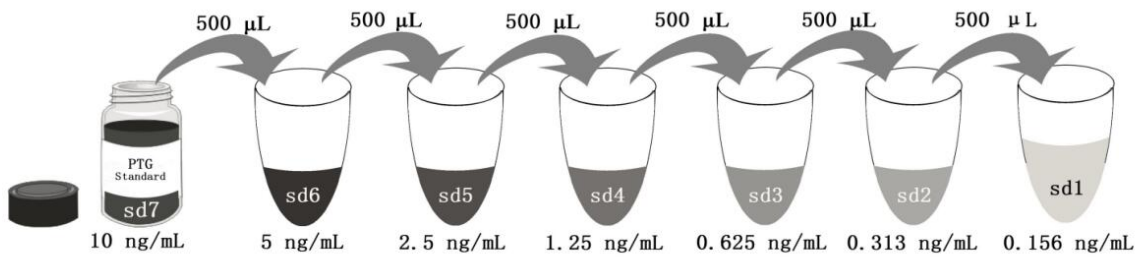
7.3 待检测样本：

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：人血清和血浆样本1:4稀释。小鼠血清和血浆样本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：

用4 mL PT 3B1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 3B1	4000 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 μ L，余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本100 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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；

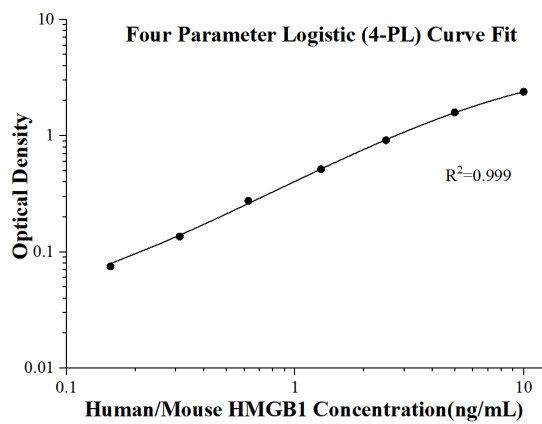
8.10 数据分析：每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD值为纵坐标，使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

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 μ L	120 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
2	HRP标记检测抗体（1 \times ）	100 μ L	40 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
3	显色 TMB	100 μ L	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37°C孵育，避光
4	终止液	100 μ 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



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.0538 0.0567	0.05525	-
0.156	0.1201 0.1405	0.1303	0.07505
0.313	0.1844 0.1973	0.19085	0.1356
0.625	0.3115 0.3488	0.33015	0.2749
1.25	0.533 0.609	0.571	0.51575
2.5	0.8927 1.0483	0.9705	0.91525
5	1.6928 1.5948	1.6438	1.58855
10	2.4033 2.4864	2.44485	2.3896

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 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%
1	20	4.78	0.47	9.92
2	20	1.18	0.06	4.80
3	20	0.50	0.03	5.96

板间精密度 (CV 间)				
样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%
1	24	7.50	0.72	9.54
2	24	1.70	0.14	8.28
3	24	0.60	0.04	7.51

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HMGB1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	96	75-122
	1:4	101	81-117

9.4 样本值

人/小鼠血浆 - 应用本试剂盒，检测人血浆样本中人/小鼠HMGB1的浓度。

样本类型	均值 (ng/mL)	%检出率	范围 (ng/mL)
人血浆 (n=24)	1.46	100	0.26-5.54
小鼠血清 (n=7)	0.75	85.7	ND-1.70

ND*=Non-detectable

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/小鼠HMGB1的灵敏度为0.04 ng/mL。

9.6 线性

小鼠血清加入高浓度的HMGB1蛋白，梯度稀释后检测样本加标线性。人血浆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：

(人血浆样本预先稀释2倍。)

稀释倍数		人血浆	小鼠血清
1:2	均值 (%)	100	82
	范围 (%)	-	81-82
1:4	均值 (%)	97	101
	范围 (%)	92-102	100-101
1:8	均值 (%)	108	109
	范围 (%)	101-116	100-118
1:16	均值 (%)	111	-
	范围 (%)	110-112	-

9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人/小鼠HMGB1。

十：参考文献

1. Miao Yu, Xiao Ming Yang, et al.(2007). Nucleic Acids Res, 36(4), 1209-1219.
2. Zheng Gang Luan, Ren Xuan Guo, et al.(2010). Immunobiology, 215(12), 0-962.
3. Sabine S Lange, Karen M Vasquez.(2009). Mol Carcinog, 48(7), 571-580.
4. Albert R Davalos, Judith Campisi.(2013). J Cell Biology, 201(4), 613-629.