

## 人HSP90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: KE00054

规格: 96T

灵敏度: 90 pg/mL

检测范围: 125 - 8000 pg/mL (检测血清、血浆、细胞上清以及尿液样本)  
250 - 16000 pg/mL (检测细胞裂解液样本)

用途: 此试剂盒用于定量检测血清、血浆、细胞上清、尿液以及细胞裂解液中人HSP90浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

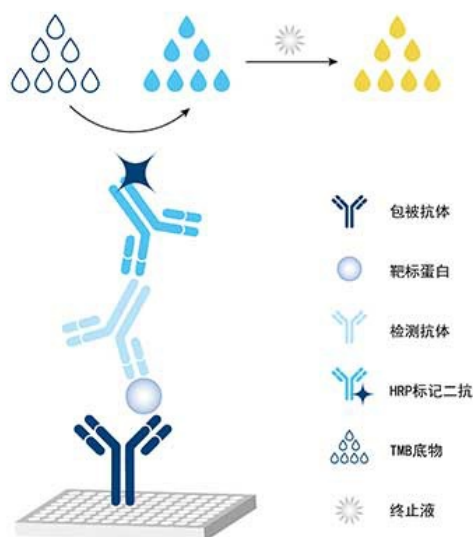
## 目录

|            |    |
|------------|----|
| 一：背景信息     | 3  |
| 二：检测原理     | 3  |
| 三：需自备的实验器材 | 3  |
| 四：试剂盒组分及存储 | 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     | 7  |
| 九：实验参数     | 8  |
| 9.1 参考标曲图  | 8  |
| 9.2 精密度    | 8  |
| 9.3 加标回收率  | 9  |
| 9.4 灵敏度    | 9  |
| 9.5 线性     | 9  |
| 十：参考文献     | 10 |

## 一：背景信息

HSP90 是一种分子伴侣，协助伴侣蛋白调节其折叠、空间构象，在维持蛋白质的稳定性和功能中发挥关键作用。HSP90的客户蛋白中包含多种致癌通路的成员，表明其与肿瘤的发生和进展存在密切联系。HSP90 主要存在于细胞质中，同时也可以释放到细胞外。分泌型 Hsp90 是碳端截短的形式。据报道，血浆Hsp90水平与临床癌症患者的肿瘤恶性程度呈正相关，可作为肿瘤恶性程度的诊断标志物。

## 二：检测原理



### ◀双抗夹心模式图 (检测抗体不标记)

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 超纯水或去离子水;
- 3.4 洗板机 (亦可手动洗板);
- 3.5 EP管 (用于稀释标准品及样本);
- 3.6 吸水毛巾或滤纸 (用于拍干);
- 3.7 烧杯和量筒;
- 3.8 100 mM PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride) 存储液 (1 g PMSF溶于57 mL异丙醇)，样本需要裂解才用;
- 3.9 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 (100×)                                                                          | 检测抗体浓缩液 (100×) **                  | 120 µL/支   | 1 支 |
| HRP-conjugated antibody (100×)                                                                     | HRP标记二抗浓缩液 (100×) **               | 120 µL/支   | 1 支 |
| Sample Diluent PT 1-ef                                                                             | 样本稀释液 PT 1-ef (用于人血清、血浆、细胞上清、尿液样本) | 30 mL/瓶    | 1 瓶 |
| Sample Diluent PT 5-ef                                                                             | 样本稀释液 PT 5-ef (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 |
| 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                                |            | 3 张 |
| <b>储存条件：</b><br>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<br>2：已开启试剂盒可在2-8℃存放7天<br>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或肝素作为抗凝剂，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)。

6.3 细胞上清：收集细胞培养液，500×g 离心5 min取上清，立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融。

6.4 尿液：收集尿液后，1000×g离心20 min，取上清，立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融。

6.5 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 $1 \times 10^7$ 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 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 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 HRP标记二抗 (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标记二抗浓缩液 (100×) 加 990 μL **抗体稀释液**进行配制，轻轻混匀。

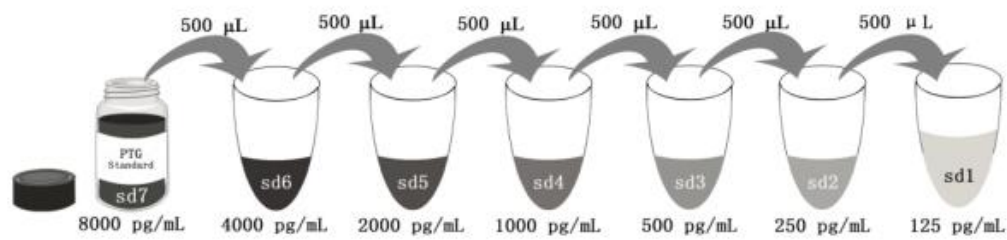
### 7.4 待检测样本：

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：人血清血浆1:2或者1:4稀释；细胞上清1:2或者1:4稀释；尿液1:2或者1:4稀释；细胞裂解液1:2或者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。

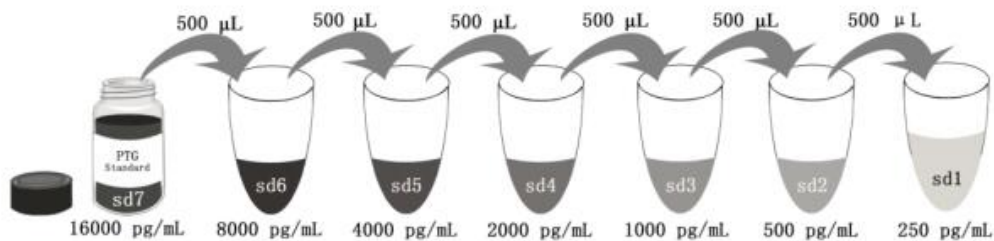
### 7.5 梯度稀释的标准品：

检测人血清、血浆、细胞上清、尿液样本，使用2mL PT 1-ef 样本稀释液复溶标准品。



|                                                   |         |        |        |        |        |        |        |
|---------------------------------------------------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 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-ef                    | 2000 µL | 500 µL | 500 µL | 500 µL | 500 µL | 500 µL | 500 µL |
|                                                   | "sd7"   | "sd6"  | "sd5"  | "sd4"  | "sd3"  | "sd2"  | "sd1"  |

检测细胞裂解液样本，使用1mL PT 5-ef 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 5-ef                    | 1000 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20-30 min（检测抗体浓缩液、HRP标记二抗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1 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 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1 h；

8.6 重复步骤8.4；

8.7 每孔加 100  $\mu$ L HRP标记二抗（1 $\times$ ）（参照试剂准备部分7.3），盖上封板膜，37°C孵育40 min；

8.8 重复步骤8.4；

8.9 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）；

8.10 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）

8.11 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；

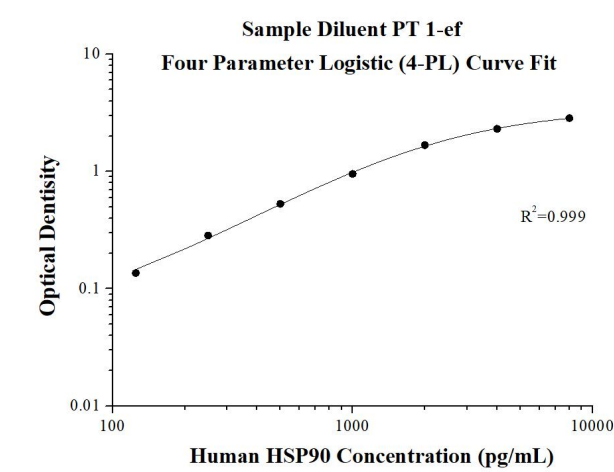
8.12 数据分析：每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

### 操作流程如下：

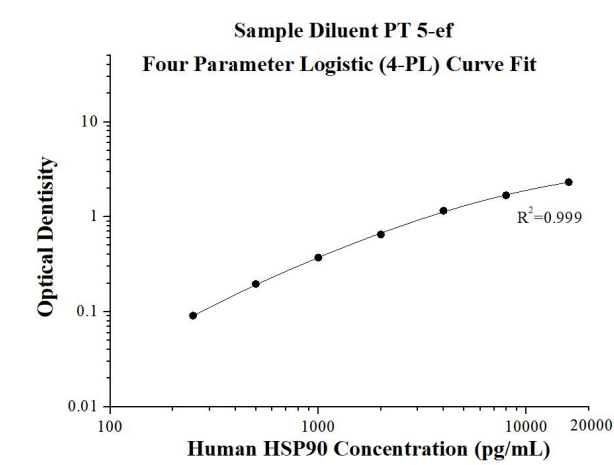
| 步骤 | 试剂                                           | 体积          | 孵育时间     | 洗涤次数  | 孵育温度         |
|----|----------------------------------------------|-------------|----------|-------|--------------|
| 1  | 标准品或样本                                       | 100 $\mu$ L | 60 分钟    | 4 次   | 覆膜后37°C孵育    |
| 2  | 检测抗体 (1 $\times$ )                           | 100 $\mu$ L | 60 分钟    | 4 次   | 覆膜后37°C孵育    |
| 3  | HRP标记二抗（1 $\times$ ）                         | 100 $\mu$ L | 40 分钟    | 4 次   | 覆膜后37°C孵育    |
| 4  | 显色 TMB                                       | 100 $\mu$ L | 15-20 分钟 | 不需要洗涤 | 覆膜后37°C孵育，避光 |
| 5  | 终止液                                          | 100 $\mu$ L | 0 分钟     | 不需要洗涤 | -            |
| 6  | 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       | 0.024<br>0.022 | 0.023   | -         |
| 125     | 0.153<br>0.165 | 0.159   | 0.136     |
| 250     | 0.291<br>0.317 | 0.307   | 0.284     |
| 500     | 0.533<br>0.57  | 0.552   | 0.529     |
| 1000    | 0.985<br>0.994 | 0.976   | 0.953     |
| 2000    | 1.626<br>1.777 | 1.702   | 1.679     |
| 4000    | 2.355<br>2.306 | 2.331   | 2.308     |
| 8000    | 2.853<br>2.862 | 2.873   | 2.85      |



| (pg/mL) | O.D            | Average | Corrected |
|---------|----------------|---------|-----------|
| 0       | 0.027<br>0.027 | 0.027   | -         |
| 250     | 0.118<br>0.117 | 0.118   | 0.091     |
| 500     | 0.229<br>0.216 | 0.223   | 0.196     |
| 1000    | 0.426<br>0.372 | 0.399   | 0.372     |
| 2000    | 0.685<br>0.672 | 0.678   | 0.651     |
| 4000    | 1.232<br>1.138 | 1.185   | 1.158     |
| 8000    | 1.761<br>1.657 | 1.709   | 1.682     |
| 16000   | 2.326<br>2.359 | 2.343   | 2.316     |

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 | 5,941.0     | 463.1 | 7.8     |
| 2           | 20 | 1,655.7     | 77.2  | 4.7     |
| 3           | 20 | 436.0       | 30.5  | 7.0     |

| 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 | 7,834.6     | 752.1 | 9.6     |
| 2            | 24 | 2,133.4     | 163.6 | 7.7     |
| 3            | 24 | 525.3       | 31.2  | 5.9     |

## 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HSP90的加标回收率实验，结果如下；

| 样本类型  | 稀释倍数 | 均值 (%) | 范围 (%)  |
|-------|------|--------|---------|
| 人血浆   | 1:2  | 98     | 83-117  |
|       | 1:4  | 101    | 82-119  |
| 细胞上清  | 1:2  | 115    | 101-126 |
|       | 1:4  | 101    | 92-113  |
| 尿液    | 1:2  | 107    | 99-124  |
|       | 1:4  | 104    | 81-121  |
| 细胞裂解液 | 1:2  | 102    | 81-119  |
|       | 1:4  | 92     | 80-111  |

## 9.4 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HSP90的灵敏度为 90 pg/mL。

## 9.5 线性

人血浆、细胞上清、尿液、细胞裂解液加入高浓度的人HSP90蛋白，梯度稀释后检测样本加标线性，线性数据如下：

(人血浆样本预先稀释2倍，细胞上清样本预先稀释2倍，尿液样本预先稀释2倍，细胞裂解液样本预先稀释2倍)

| 稀释倍数 |        | 人血浆<br>(样本稀释液 PT1-ef) | 细胞上清<br>(样本稀释液 PT1-ef) | 尿液<br>(样本稀释液 PT1-ef) | 细胞裂解液<br>(样本稀释液 PT5-ef) |
|------|--------|-----------------------|------------------------|----------------------|-------------------------|
| 1:2  | 均值 (%) | 98                    | 94                     | 98                   | 101                     |
|      | 范围 (%) | 90-102                | 92-97                  | 88-107               | 99-104                  |
| 1:4  | 均值 (%) | 101                   | 101                    | 100                  | 111                     |
|      | 范围 (%) | 95-107                | 89-124                 | 86-124               | 100-122                 |
| 1:8  | 均值 (%) | 102                   | 96                     | 92                   | -                       |
|      | 范围 (%) | 97-103                | 86-114                 | 85-98                | -                       |
| 1:16 | 均值 (%) | 105                   | 101                    | 93                   | -                       |
|      | 范围 (%) | 97-115                | 87-124                 | 87-98                | -                       |

## 十：参考文献

1. Garcia-Carbonero R., et al. Inhibition of HSP90 molecular chaperones: moving into the clinic. *Lancet Oncol.* 14(9):e358-69 (2013).
2. Wang, X., et al. The regulatory mechanism of Hsp90alpha secretion and its function in tumor malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(50):21288-93 (2009).