

Speedy™ 人HMGB1一步法ELISA检测试剂盒

请在实验前仔细阅读本说明书

产品货号: SE50009
规格: 96T
灵敏度: 0.05 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

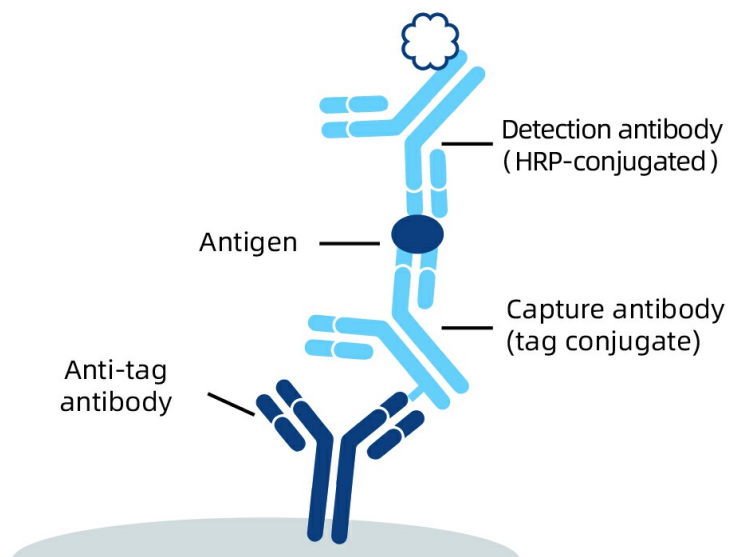
目录

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	8
9.3 加标回收率	8
9.4 样本值	8
9.5 灵敏度	8
9.6 线性	9
9.7 特异性	9
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



抗标签抗体预先包被于板孔，可结合带标签的捕获抗体。抗原或样本、捕获抗体及辣根过氧化物酶（HRP）标记的检测抗体加入后，在溶液中形成夹心复合物。在HRP催化下，四甲基联苯胺（TMB）使底物溶液由无色变蓝，加入终止液后变黄。溶液颜色深浅与结合蛋白量成正比。测量波长为450 nm，校正波长为630 nm。

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。也可使用Proteintech 公司数据分析网站：<https://www.ptgcn.com/products/elisa-kits/>;
- 3.8 微孔板恒温振荡器。

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
Capture antibody (100X)	捕获抗体浓缩液 (100×) **	60 µL/支	1 支
Detection antibody, HRP-conjugated (100X)	HRP 标记检测抗体浓缩液 (100×) **	60 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	15 mL/瓶	1 瓶
Wash Buffer Concentrate (20×)	浓缩洗涤液 (20×)	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，详见7.4部分，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×）的配制：

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1×洗涤液。

7.2 抗体混合液（1×）的配制：

开盖前瞬时离心，将捕获抗体和检测抗体稀释分别按1:100比例稀释到同一管稀释液中，配制成检测所需的工作液。例如：将50 μL包被抗体浓缩液（100×）和50 μL检测抗体浓缩液（100×）加入 4900 μL抗体稀释液，混匀配制成1×抗体混合液。

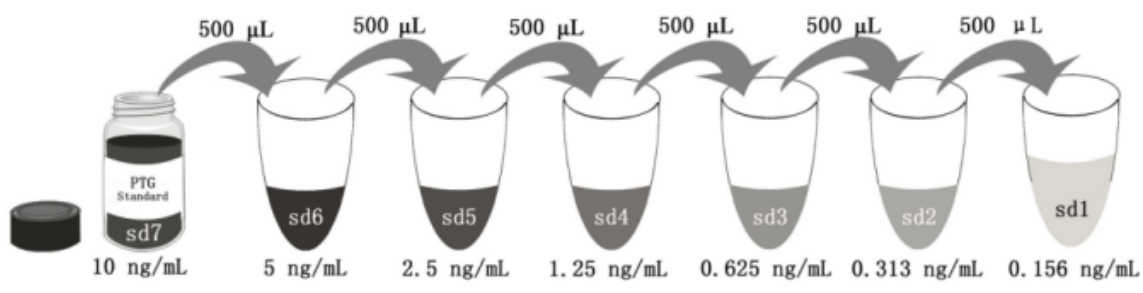
7.3 待检测样本：

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1:2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：

使用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20-30 min (捕获抗体浓缩液和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50 μ L,余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本50 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 每孔加50 μ L 抗体混合液(1 $\times$)(参照试剂准备部分7.2),盖上封板膜,恒温振荡器上37°C 400 rpm 孵育 1 h(若无恒温振荡器,此步骤建议37°C静置孵育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;

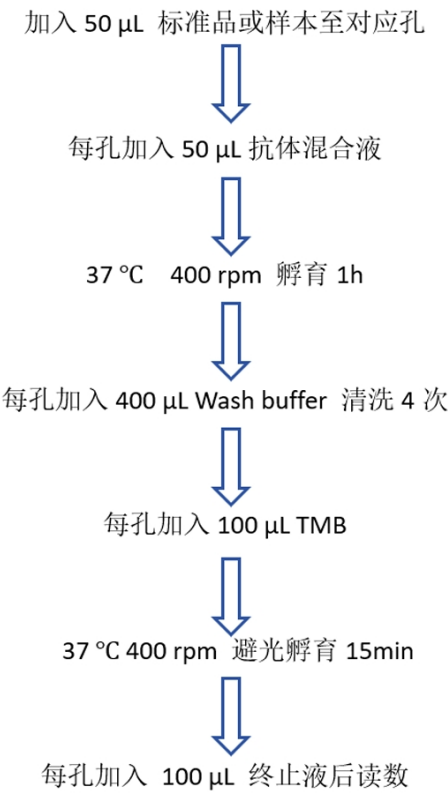
8.5 显色:每孔加TMB显色液100 μ L,恒温振荡器上37°C 400 rpm 孵育15-20 min(如果颜色偏浅,可适当延长显色时间,不超过30 min;保持显色底物始终处于避光状态,显色底物在加样前应是无色透明,如有变色,请勿使用);

8.6 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)

8.7 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;

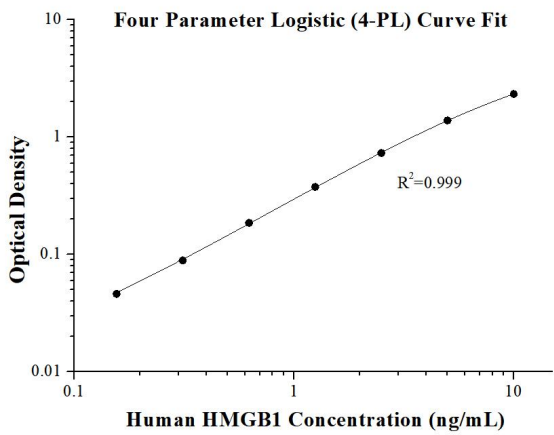
8.8 数据分析:每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值,设置复孔,取其平均值。以标准品的浓度为横坐标,OD值为纵坐标,使用专业软件(如Origin、ELISACalc等)进行四参数拟合(4-PL),根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度,乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

操作流程如下：



九：实验参数

9.1 参考标曲图



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.044 0.048	0.0420	-
0.156	0.0894 0.0879	0.08865	0.0463
0.3125	0.1353 0.1279	0.1316	0.0892
0.625	0.2318 0.2243	0.22805	0.1857
1.25	0.4231 0.4137	0.4184	0.376
2.5	0.7867 0.7612	0.774	0.73155
5	1.4416 1.4164	1.429	1.3866
10	2.3673 2.3809	2.3741	2.3317

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 8 次;

板间精密度: 3个不同浓度的样本在板间重复测定 16 次。

板内精密度 (CV内)					板间精密度 (CV 间)				
样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%	样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%
1	8	4.71	0.10	2.21	1	16	4.66	0.21	4.40
2	8	1.28	0.05	4.28	2	16	1.25	0.05	3.89
3	8	0.66	0.03	4.90	3	16	0.66	0.03	4.85

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 (%)
人血清	1:2	92	75-111
	1:4	118	109-128

9.4 样本值

人血清 - 应用本试剂盒, 检测人血清样本中人HMGB1的浓度。

样本类型	均值 (ng/mL)	检出率 (%)	范围 (ng/mL)
人血清样本 (n=8)	3.54	75%	ND-26.74

ND*=未检出

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HMGB1的灵敏度为0.05 ng/mL。

9.6 线性

人血清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：

稀释倍数		人血清
1:2	均值 (%)	100
	范围 (%)	-
1:4	均值 (%)	118
	范围 (%)	115-122
1:8	均值 (%)	88
	范围 (%)	73-103
1:16	均值 (%)	80
	范围 (%)	79-81

9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人HMGB1。

十：参考文献

1. Yu, Miao et al. Nucleic acids research vol. 36,4 (2008): 1209-19.
2. Luan, Zheng-Gang et al. Immunobiology vol. 215,12 (2010): 956-62.
3. Lange, Sabine S, and Karen M Vasquez. Molecular carcinogenesis vol. 48,7 (2009): 571-80.
4. Davalos, Albert R et al. The Journal of cell biology vol. 201,4 (2013): 613-29.