

高迁移率族蛋白 1 酶联免疫吸附测定试剂盒




HMGB1 ELISA Kit

本产品冰袋运输: 保存于 4℃ (其中 **标准品** 需保存于 -20℃), 保质期 6 个月; **标准品** 如存放于 4℃, 1~2 周内有效。

货号规格

HJ216 96次

产品特点

-  **高灵敏度**——多次重复结果表明, 最小检出量为 0.8 ng/mL;
-  **高特异性**——与 HMGB-2 蛋白有 12.7% 的交叉反应性;
-  **重复性好**——板内, 板间变异系数均小于 10%。

产品简介

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法检测人/小鼠/大鼠/牛/狗/猪等来源样品中高迁移率族蛋白 1 (HMGB1) 的浓度。HMGB1 捕获抗体已经预包被于酶标板上, 当加入样品或标准品时, 其中的 HMGB1 会与捕获抗体结合, 而其它游离成分则会通过洗涤被除去。接着, 再加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗 HMGB1 抗体后, 抗 HMGB1 抗体与 HMGB1 接合, 形成夹心的免疫复合物, 其它游离成分则通过洗涤被除去。最后加入显色剂, 若样品中存在 HMGB1, 则会形成免疫复合物, 其上连接的 HRP 会催化无色的显色剂氧化生成蓝色物质, 而后加入终止液, 最终产物呈黄色。通过酶标仪检测, 读其 450nm 处的 OD 值, HMGB1 浓度与 OD₄₅₀ 值之间呈正比, 通过标准品绘制标准曲线, 对照未知样品中 OD 值, 即可计算出样品中 HMGB1 浓度。

背景简介

高迁移率族蛋白 1 (HMGB1) 又名 HMG-1, 是 HMGB 家庭三个成员之一, 这三个蛋白分别是 HMGB1、HMGB2 和 HMGB3。HMGB1 是非组蛋白型染色体结合蛋白, 存在于脊椎动物的细胞核内, 一般与双链 DNA 结合。

HMGB1 是一种高度保守的核蛋白, 在哺乳动物细胞内普遍存在。近年来研究发现, 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。HMGB1 参与多种疾病如脓毒症、关节炎、结肠炎和急性肺损伤等疾病晚期炎症反应。动物研究表明, 在早期炎症介质释放后给予 HMGB1 抗体可对动物脓毒症、急性肺损伤等疾病发挥保护作用, 为临床提供了更为广泛的预防治疗方法。

产品内容

组分	体积或数量
HMGB1 预包被板	12 条
标准品稀释液	10 mL
HMGB1 标准品	≥2 支 (冻干)
HRP 标记的 HMGB1 抗体	10 mL
浓缩洗涤液 (20×)	30 mL
显色剂 TMB	10 mL
终止液	5 mL
封板胶纸	3 张

操作步骤

◆ 样品制备

1. 根据样品种类选择相应的处理方法:

- A. 血清样品: 将全血在室温下静置 0.5~2h, 待其自然凝固并析出血清后, 离心取黄色上清即可 (4°C, 1000~2000×g, 10 min), 注意请勿吸取沉淀, 制备好的血清需置于冰上待用, 请勿在其中添加任何防腐剂或抗凝剂;
- B. 血浆样品: 使用 EDTA 对全血进行抗凝处理后, 混合均匀置于冰上, 离心取黄色上清即可 (4°C, 1000~2000×g, 10 min), 注意请勿吸取沉淀, 制备好的血浆需置于冰上待用;

注意: ① 样品在 2~8°C 下保存请勿超过 24h, 如需长期存放 (3 个月以上), 应冻存在 -20°C。使用过程中请避免反复冻融;

② 请保证待测样品清澈透明, 检测前如发现样品中有悬浮物, 需通过离心去除;

③ 为了保证检测结果准确, 请勿使用溶血、黄疸、高血脂或污染的样品。

◆ 检测准备工作

2. 试剂盒自冰箱取出后, 请置于室温平衡 20 min; 检测完成后, 剩余试剂请及时置于 4°C 保存;
3. 将 **浓缩洗涤液 (20×)** 用双蒸水或去离子水稀释为 1× 洗涤液;
4. 按标准品标签上注明的复溶体积, 用 **标准品稀释液** 复溶使标准品终浓度达到 100 ng/mL, 室温操作, 请**严格控制**在 25~28°C, 静置 15~20 min 后轻轻混悬, 用移液器吸打数次, 使其彻底溶解, 然后按下表用 **标准品稀释液** 倍比梯度稀释后依次加入检测孔中。(最高浓度为 100 ng/mL, 将 **标准品稀释液** 作为浓度 0 ng/mL。)

管号	稀释液用量 (μL)	复溶后标准品用量 (μL)	标准品的最终浓度 (ng/mL)
A	0	250	100
B	250	250	50
C	250	250 (从 B 管中取)	25
D	250	250 (从 C 管中取)	12.5
E	250	250 (从 D 管中取)	6.25
F	250	250 (从 E 管中取)	3.125
G	250	250 (从 F 管中取)	1.5625
H	250	0	0

注意: 标准品复溶加样后, 剩余部份请丢弃。

◆ 检测流程

5. 通过计算确定一次实验所需的板条数, 取出所需板条放置于框架内, 多余的板条请放回铝箔袋密封, 保存于 4°C;

注意: ① 标准品和样品建议做双复孔检测;

② 建议设置本底校正孔, 即空白孔, 只加入相应体积的 **显色剂 TMB** 和 **终止液** 即可;

③ 每次实验均需绘制标准曲线。

6. 将样品和不同浓度标准品 (100 μL/孔) 分别加入相应孔中, 用封板胶纸封住反应孔, 室温孵育 120 min。不同样品 HMGB1 含量并不一致, 一般初始稀释 2 倍开始检测, 如果超出标准曲线范围请加大稀释倍数后重新检测;

注意: ① 请查阅相关文献确定样品中待检测蛋白的大致浓度, 若其大于或小于本试剂盒的最高或最低标准品浓度, 请将样品适当稀释或浓缩后再进行检测;

② 整个加样过程不宜超过 10min, 否则可能会影响检测结果。

7. 洗板 5 次, 每孔 1×洗涤液用量为 300 μL, 注入与吸出间隔 15~30 s, 洗完后将板倒扣在厚吸水纸上拍干;

注意: 洗涤过程至关重要, 洗涤不充分会导致结果产生较大误差。

8. 加入 **HRP 标记的 HMGB1 抗体**(100 μL/孔, 无需稀释)。用封板胶纸封住反应孔, 室温孵育 60 min;

9. 洗板 5 次, 方法同步骤 8;

10. 加入 **显色剂 TMB**(100 μL/孔), 避光室温孵育 10~20 min;

注意: 在保存和使用时, 请勿将 TMB 接触氧化剂和金属。

11. 加入 **终止液**(50 μL/孔), 混匀后即刻使用酶标仪测量 OD450, 同时设定 540 nm 或 570 nm 作为校正波长, 即可计算得到校正吸光度值(OD450-OD540 或 OD450-OD570);

注意: 读取 OD 值建议在 10 min 内完成。

◆ 数据分析

12. 绘制标准曲线。以标准品浓度作横坐标, OD 值作纵坐标, 利用计算机软件作四参数逻辑(4-PL)曲线拟合创建标准曲线, 通过样品的 OD 值即可在标准曲线上计算出其相应浓度。

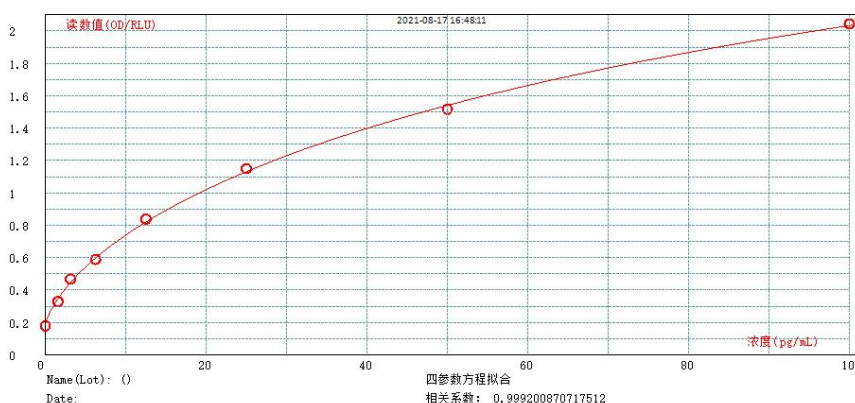
注意: ① 复孔 OD 值在 20% 的差异范围内结果才有效, 复孔 OD 值取平均后可作为测量值;

② 每个标准品或样品的 OD 值应减去本底校正孔的 OD 值;

③ 若样品 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。

◆ 标准曲线范例

高迁移率族蛋白 1 (HMGB1) 参考标准曲线



注意: 本图仅供参考, 应以同次试验标准品所绘标准曲线计算样品含量。

注意事项

1. **浓缩洗涤液** 低温情况下可能会出现结晶, 请水浴加热使结晶完全溶解后再配制工作液;
2. 严禁混用不同批号试剂盒的组分;
3. 加样过程请避免产生气泡, 实验操作过程中一定要保证试剂充分混匀, 否则会使结果产生较大误差;
4. 说明书中提到的室温条件, 请严格控制在 25~28°C;
5. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作;
6. 本产品仅限科研使用。

版本号: 21L04