

## 热休克蛋白 90elisa 方法说明书

### 标本要求:

1. 标本采集后尽早进行提取, 提取按相关文献进行, 提取后应尽快进行实验。若不能马上进行试验, 可将标本放于 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存, 但应避免反复冻融
2. 不能检测含  $\text{NaN}_3$  的样品, 因  $\text{NaN}_3$  抑制辣根过氧化物酶的 (HRP) 活性。

### 样本处理及要求:

1. 血清: 全血标本请于室温放置 2 小时或  $4^{\circ}\text{C}$  过夜后于  $1000\text{g}$  离心 20 分钟, 取上清即可检测, 或将标本放于 $-20^{\circ}\text{C}$ 或 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存, 但应避免反复冻融。
2. 血浆: 可用 EDTA 或肝素作为抗凝剂, 标本采集后 30 分钟内于  $2 - 8^{\circ}\text{C}$   $1000\text{g}$  离心 20 分钟, 或将标本放于 $-20^{\circ}\text{C}$ 或 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存, 但应避免反复冻融。
3. 组织匀浆: 用预冷的 PBS ( $0.01\text{M}$ ,  $\text{pH}=7.4$ ) 冲洗组织, 去除残留血液 (匀浆中裂解的红细胞会影响测量结果), 称重后将组织剪碎。将剪碎的组织与对应体积的 PBS (一般按 1:9 的重量体积比, 比如  $1\text{g}$  的组织样品对应  $9\text{mL}$  的 PBS, 具体体积可根据实验需要适当调整, 并做好记录。推荐在 PBS 中加入蛋白酶抑制剂) 加入玻璃匀浆器中, 于冰上充分研磨。为了进一步裂解组织细胞, 可以对匀浆液进行超声破碎, 或反复冻融。将匀浆液于  $5000\times\text{g}$  离心  $5\sim 10$  分钟, 取上清检测。
4. 细胞培养物上清或其它生物标本:  $1000\text{g}$  离心 20 分钟, 取上清即可检测, 或将标本放于 $-20^{\circ}\text{C}$ 或 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存, 但应避免反复冻融。

### 实验原理:

本试剂盒应用双抗体夹心法测定标本中血清素/血清胺 (ST) 水平。用纯化的血清素/血清胺 (ST) 抗体包被微孔板, 制成固相抗体, 往包被单抗的微孔中依次加入血清素/血清胺 (ST), 再与 HRP 标记的血清素/血清胺 (ST) 抗体结合, 形成抗体-抗原-酶标抗体复合物, 经过彻底洗涤后加底物 TMB 显色。TMB 在 HRP 酶 S 的催化下转化成蓝色, 并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的血清素/血清胺 (ST) 呈正相关。用酶标仪在  $450\text{nm}$  波长下测定吸光度 (OD 值), 通过标准曲线计算样品中血清素/血清胺 (ST) 浓度。

### 试剂盒组成 :

- 1、30 倍浓缩洗涤液  $20\text{ml}\times 1$  瓶 7 终止液  $6\text{ml}\times 1$  瓶
- 2、酶标试剂  $6\text{ml}\times 1$  瓶 8 标准品 ( $160\text{pg}/\text{ml}$ )  $0.5\text{ml}\times 1$  瓶
- 3、酶标包被板 12 孔 $\times 8$  条 9 标准品稀释液  $1.5\text{ml}\times 1$  瓶
- 4、样品稀释液  $6\text{ml}\times 1$  瓶 10 说明书 1 份
- 5、显色剂 A 液  $6\text{ml}\times 1$  瓶 11 封板膜 2 张
- 6、显色剂 B 液  $6\text{ml}\times 1/\text{瓶}$  12 密封袋 1 个

### 试剂盒特点:

- 1、高效、灵敏、特异的抗体;
- 2、稳定的重复性和可靠性;
- 3、吸附性能好, 空白值低, 孔底透明度高的固相载体;
- 4、适用血清、血浆、组织匀浆液、细胞培养上清液、尿液等等多种标本类型;
- 5、节省实验经费。

### 操作步骤:

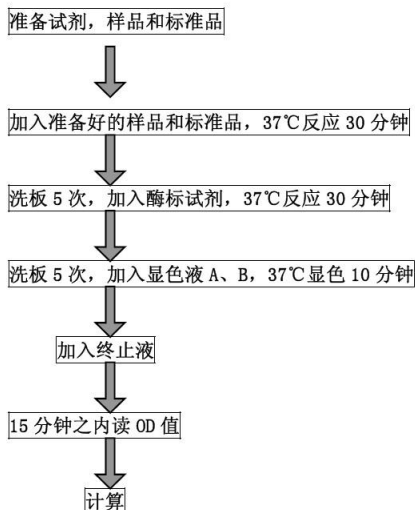
1. 标准品的稀释: 本试剂盒提供原倍标准品一支, 用户可按照下列图表在小试管中进行稀释。

80pg/ml	5 号标准品	150 $\mu\text{l}$ 的原倍标准品加入 150 $\mu\text{l}$ 标准品稀释液
40pg/ml	4 号标准品	150 $\mu\text{l}$ 的 5 号标准品加入 150 $\mu\text{l}$ 标准品稀释液

		液
20pg/ml	3号标准品	150 μl 的 4号标准品加入 150 μl 标准品稀释液
10pg/ml	2号标准品	150 μl 的 3号标准品加入 150 μl 标准品稀释液
5pg/ml	1号标准品	150 μl 的 2号标准品加入 150 μl 标准品稀释液

2. 加样：分别设空白孔（空白对照孔不加样品及酶标试剂，其余各步操作相同）、标准孔、待测样品孔。在酶标包被板上标准品准确加样 50 μl，待测样品孔中先加样品稀释液 40 μl，然后再加待测样品 10 μl（样品最终稀释度为 5 倍）。加样将样品加于酶标板孔底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀。
3. 温育：用封板膜封板后置 37℃温育 30 分钟。
4. 配液：将 30 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 30 倍稀释后备用
5. 洗涤：小心揭掉封板膜，弃去液体，甩干，每孔加满洗涤液，静置 30 秒后弃去，如此重复 5 次，拍干。
6. 加酶：每孔加入酶标试剂 50 μl，空白孔除外。
7. 温育：操作同 3。
8. 洗涤：操作同 5。
9. 显色：每孔先加入显色剂 A 50 μl，再加入显色剂 B 50 μl，轻轻震荡混匀，37℃避光显色 10 分钟。
10. 终止：每孔加终止液 50 μl，终止反应（此时蓝色立转黄色）。
11. 测定：以空白孔调零，450nm 波长依序测量各孔的吸光度（OD 值）。测定应在加终止液后 15 分钟以内进行。

#### 操作程序总结：



#### 计算：

以标准物的浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，在坐标纸上绘出标准曲线，根据样品的 OD 值由标准曲线查出相应的浓度；再乘以稀释倍数；或用标准物的浓度与 OD 值计算出标准曲线的直线回归方程式，将样品的 OD 值代入方程式，计算出样品浓度，再乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。

#### 注意事项：

1. 试剂盒从冷藏环境中取出应在室温平衡 15-30 分钟后方可使用，酶标包被板开封后如未用完，板条应装入密封袋中保存。
2. 浓洗涤液可能会有结晶析出，稀释时可在水浴中加温助溶，洗涤时不影响结果。
3. 各步加样均应使用加样器，并经常校对其准确性，以避免试验误差。一次加样时间最好控制在 5 分钟内，如标本数量多，推荐使用排枪加样。
4. 请每次测定的同时做标准曲线，最好做复孔。如标本中待测物质含量过高（样本 OD 值大于标准品孔第一孔的 OD 值），请先用样品稀释液稀释一定倍数（n 倍）后再测定，计算时请最后乘以总稀释倍数（ $\times n \times 5$ ）。
5. 封板膜只限一次性使用，以避免交叉污染。
6. 底物请避光保存。
7. 严格按照说明书的操作进行，试验结果判定必须以酶标仪读数为准。
8. 所有样品，洗涤液和各种废弃物都应按传染物处理。
9. 本试剂不同批号组分不得混用。