



## 人热休克蛋白 40 (HSP40) 检测试剂盒

### 使用说明书

#### 人热休克蛋白 40 (HSP40) 检测试剂盒检测原理:

本试剂盒采用双抗体夹心法: 抗人热休克蛋白 40 (HSP40) 单抗包被于酶标板上, 标本和标准品中的热休克蛋白 40 (HSP40) 会与单抗结合, 游离的成份被洗去。加入酶标抗体, 抗人热休克蛋白 40 (HSP40) 抗体与结合在单抗上的人热休克蛋白 40 (HSP40) 结合而形成免疫复合物, 游离的成分被洗去。加入显色底物, 若反应孔中有热休克蛋白 40 (HSP40), 辣根过氧化物酶会使无色的显色剂现蓝色, 加终止液变黄。在 450nm 处测 OD 值, 热休克蛋白 40 (HSP40) 浓度与 OD450 值之间呈正比, 可通过绘制标准曲线求出标本中的热休克蛋白 40 (HSP40) 浓度。选用世界著名生产厂家的原料, 采用专业体外诊断试剂生产技术制造。适用于体外定量检测人血清、血浆或细胞培养上清液中天然重组人热休克蛋白 40 (HSP40) 浓度。仅供科研使用, 使用前请仔细阅读说明书并检查试剂组分。

#### 人热休克蛋白 40 (HSP40) 检测试剂盒组成:

中文名称	英文名称	规格	保存
ELISA 酶标板 (可拆卸)	Micro ELISA Plate(Dismountable)	8×12 / 8×6*	4℃/-20℃ #
冻干标准品	Reference Standard	2/1 支*	4℃/-20℃ #
标准品&样品稀释液	Reference Standard & Sample Diluent	1 瓶 20mL/12mL*	4℃
浓缩生物素化抗体	Concentrated Biotinylated Detection Ab	1 支 120μL/70μL*	4℃/-20℃ #
生物素化抗体稀释液	Biotinytated Detection Ab Diluent	1 瓶 10mL/6mL*	4℃
浓缩 HRP 酶结合物	Concentrated HRP Conjugate	1 支 120μL/70μL*	4℃(避光)
酶结合物稀释液	HRP Conjugate Diluent	1 瓶 10mL/6mL*	4℃
浓缩洗涤液 (25×)	Concentrated Wash Buffer (25×)	1 瓶 30mL/16mL*	4℃
底物溶液(TMB)	Substrate Reagent	1 瓶 10mL/6mL*	4℃(避光)
反应终止液	Stop Solution	1 瓶 10mL/6mL*	4℃
封板覆膜	Plate Sealer	5/3 张*	
产品说明书	Product Description	1 份	



质检报告

Certificate of Analysis

1 份

**特别说明:**

\*: [96T/48T] (打开包装后请及时检查所有物品是否齐全完整)

#: 一周内使用可存于 4℃, 需长时间存放或多次使用建议存于-20℃.

相关试剂在分装时会比标签上标明的体积稍多一些, 请在使用时量取而非直接倒出!

**人热休克蛋白 40 (HSP40) 检测试剂盒样品收集:**

1. 血清: 全血样品于室温放置 2 小时或 4℃ 过夜后于 1000×g 离心 20 分钟, 取上清即可检测, 收集血液的试管应为一次性的无热原, 无内毒素试管。
2. 血浆: 抗凝剂推荐使用 EDTA-Na<sub>2</sub>, 样品采集后 30 分钟内于 1000×g 离心 15 分钟, 取上清即可检测。避免使用溶血, 高血脂样品。
3. 组织匀浆: 用预冷的 PBS (0.01M, 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 1g 的组织样品对应 9mL 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。最后将匀浆液于 5000×g 离心 5~10 分钟, 取上清检测。
4. 细胞培养上清: 取细胞培养上清于 1000×g 离心 20 分钟, 除去杂质及细胞碎片。取上清检测。
5. 其它生物样品: 1000×g 离心 20 分钟, 取上清即可检测
6. 样品应清澈透明, 悬浮物应离心去除。
7. 样品收集后若在 1 周内进行检测的可保存于 4℃, 若不能及时检测, 请按一次使用量分装, 冻存于-20℃ (1 个月内检测), 或-80℃ (6 个月内检测), 避免反复冻融。
8. 如果您的样品中检测物浓度高于标准品最高值, 请根据实际情况, 做适当倍数稀释 (建议先做预实验, 以确定稀释倍数)。

**试验所需自备物品:**

1. 酶标仪 (450nm 波长滤光片)
2. 高精度移液器, EP 管及一次性吸头: 0.5-10μL, 2-20μL, 20-200μL, 200-1000μL
3. 37℃ 恒温箱, 双蒸水或去离子水
4. 吸水纸

**人热休克蛋白 40 (HSP40) 检测试剂盒检测前准备工作:**

1. 请提前 20 分钟从冰箱中取出试剂盒, 平衡至室温。
2. 将浓缩洗涤液用双蒸水稀释 (1:25)。未用完的放回 4℃。从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶, 属于正常现象, 可用 40℃ 水浴微加热使结晶完全溶解后再配制洗涤液 (加热温度不要超过 50℃, 使用时洗涤液应为室温)。当日使用。
3. 标准品: 于 10000×g 离心 1 分钟, 加入标准品 & 样品稀释液 1.0mL 至冻干标准品中, 旋紧管盖, 静置 10 分钟, 上下颠倒数次, 待其充分溶解后, 用移液器将其轻轻混匀 (浓度为 10ng/mL)。然后根据需要进行倍比



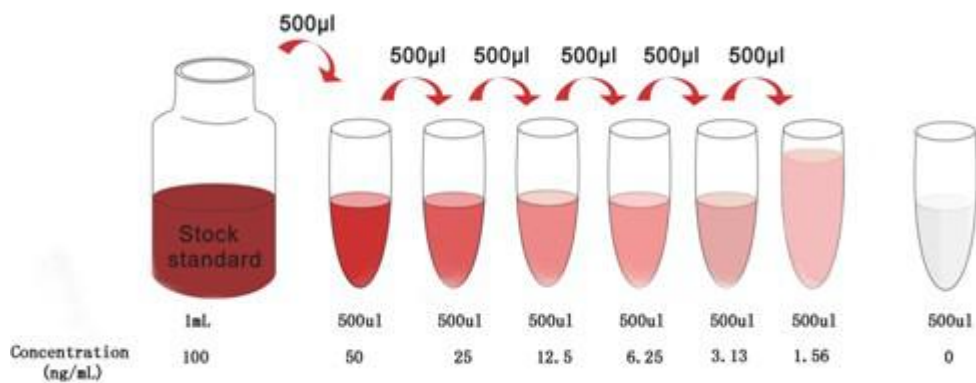
稀释（注：不要直接在反应孔中进行倍比稀释）。建议配制成以下浓度：按照稀释方法图例 标准品&样品稀释液直接作为空白孔 0ng/mL。如配制 5ng/mL 标准品：取 0.5mL 10ng/mL 的上述标准品加入含有 0.5mL 标准品&样品稀释液的 EP 管中，混匀即可，其余浓度依此类推。

4. 生物素化抗体工作液：实验前计算当次实验所需用量（以 100 $\mu$ L/孔计），实际配制时应多配制 100-200 $\mu$ L。使用前 15 分钟，以生物素化抗体稀释液稀释浓缩生物素化抗体 (1:100) 成工作浓度。当日使用。

5. 酶结合物工作液：实验前计算当次实验所需用量（以 100 $\mu$ L/孔计），实际配制时应多配制 100-200 $\mu$ L。使用前 15 分钟，以酶结合物稀释液稀释浓缩 HRP 酶结合物 (1:100) 成工作浓度。

当日使用。

**标准品稀释方法图例：**（以 500 $\mu$ L/管为例，也可根据实际用量来稀释，如 200 $\mu$ L/管）



#### 洗涤方法：

任何一个成功的 ELISA 检测，正确的洗板方法是非常关键和重要的一方面。连贯的洗板也很有必要的。在稀释浓缩洗涤液时，请使用去离子水或者蒸馏水。

#### ◆ 洗涤瓶或多通道移液器

保证洗瓶内压强良好或者移液器的管头被适当调整并且无碎屑。检查板内的板条是否安好。将板条编号以防在倾泄的时候松动便于调整。首先，倾泄酶标板以清空内容物。根据试剂盒内推荐的体积向每孔内滴加洗液。若实验步骤中要求浸泡，则定时将每孔浸泡完全。将板内液体倾倒完全，用干净纸巾擦拭。按照说明书所示重复以上步骤。最后一次洗板之后，将板内液体倾倒完全，用干净纸巾拍打表面并擦干。切勿让孔内干燥。按照试剂盒内说明书迅速进行下一步实验操作。

#### ◆ 自动洗板仪

将自动洗板仪接入适当真空（根据制造商的说明）。确保每管都被适当抽吸。首先，通过吸或者倾倒将板清空。根据试剂盒内推荐的体积向每孔内滴加洗液。若实验步骤中要求浸泡，则定时将每孔浸泡完全。完全抽吸各孔，保证没有洗液残留。在孔内液体被完全抽走之后不要再将装置至于孔内过分抽吸。按照说明书所示重复以上步骤。最后一次洗板之后，将板内液体倾倒完全，用干净纸巾拍打表面并擦干。切勿让孔内干燥。按照试剂盒内说明书迅速进行下一步实验操作。

#### 操作步骤：

实验开始前，各试剂均应平衡至室温；试剂或样品配制时，均需充分混匀，并尽量避免起泡。



1. 加样：分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。空白孔加标准品&样品稀释液 100 $\mu$ L，余孔分别加标准品或待测样品 100 $\mu$ L，注意不要有气泡，加样时将样品加于酶标板底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀。给酶标板覆膜，37 $^{\circ}$ C 孵育 90 分钟。为保证实验结果有效性，每次实验请使用新的标准品溶液。
2. 弃去液体，甩干，不用洗涤。每个孔中加入生物素化抗体工作液 100 $\mu$ L（在使用前 15 分钟内配制），酶标板加上覆膜，37 $^{\circ}$ C 温育 1 小时。
3. 弃去孔内液体，甩干，洗板 3 次，每次浸泡 1-2 分钟，大约 350 $\mu$ L/每孔，甩干并在吸水纸上轻拍将孔内液体拍干。
4. 每孔加酶结合物工作液（临用前 15 分钟内配制）100 $\mu$ L，加上覆膜，37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟。
5. 弃去孔内液体，甩干，洗板 5 次，方法同步骤 3。
6. 每孔加底物溶液 (TMB) 90 $\mu$ L，酶标板加上覆膜 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 分钟左右（根据实际显色情况酌情缩短或延长，但不可超过 30 分钟。当标准孔出现明显梯度时，即可终止）。
7. 每孔加终止液 50 $\mu$ L，终止反应，此时蓝色立转黄色。终止液的加入顺序应尽量与底物溶液的加入顺序相同。
8. 立即用酶标仪在 450nm 波长测量各孔的光密度 (OD 值)。应提前打开酶标仪电源，预热仪器，设置好检测程序。
9. 实验结束后将未用完的试剂按规定的保存温度放回冰箱保存。

#### **人热休克蛋白 40 (HSP40) 检测试剂盒注意事项：**

- ◆ 仔细阅读说明书。
- ◆ 检查试剂盒标签上的有效期。如果超过有效期，请勿使用。
- ◆ 按说明书确定所有试剂齐全（数量、体积）。
- ◆ 标本制备要规范，每份标本体积要按 2-3 个复孔以上的量制备（贮存），尽量分装做备份。短期内无法实验者，注意低温保存。
- ◆ 准备好所有实验额外所需物品，（比如移液器，试管，清洗器，酶标仪）。
- ◆ 按说明书将所用试剂平衡至室温，根据检测标本数量确定所需试剂的量。
- ◆ 检查试剂盒内每种试剂的贮存条件，保证所有试剂均按照试剂盒内说明书推荐的条件存储。
- ◆ 检查不稳定或者变质的试剂溶液（比如沉淀或变色）。有些试剂，比如标准品稀释液或者检测稀释液，可能在设计时就含有沉淀物。所有试剂在滴入酶标板之前，必需充分混匀。而由于沉淀物的特性，在加入酶标板之前，必需不停搅拌。
- ◆ 保证充分的孵育时间和温度。
- ◆ 切勿使用不同生产批号的试剂取代现有试剂或混合现有试剂。
- ◆ 在混合或溶解蛋白溶液时，避免泡沫产生。
- ◆ 在实验开始之前，安排好实验流程。
- ◆ 在实验开始之前，清洁工作台。
- ◆ 若有问题，应与我公司或代理商的技术支持联系

#### **结果判断：**



1. 每个标准品的 OD 值减去空白孔的 OD 值后作图，如设置复孔，则应取其平均值计算。以标准品的浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，绘出标准曲线。亦可以 OD 值为横坐标，标准品的浓度为纵坐标，绘出标准曲线。
2. 推荐使用专业的曲线制作软件，如 curve expert 1.3 或 1.4，在软件界面既可根据样品 OD 值，由标准曲线查出相应的浓度，乘以稀释倍数；亦可将样品的 OD 值代入标准曲线的拟合方程式，计算出样品浓度，再乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。
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。

#### **人热休克蛋白 40 (HSP40) 检测试剂盒灵敏度、检测范围、特异性和重复性：**

- 灵敏度：最小可测：0.043ng/mL
- 检测范围：0.156-10ng/mL
- 重复性：板内，板间变异系数均<10%。
- 特异性：可检测重组或天然的人热休克蛋白 40 (HSP40)，且与其它相关蛋白无交叉反应。

#### **操作概要**

1. 在各孔中加入标准品或样品各 100 $\mu$ L，37 $^{\circ}$ C 孵育 90 分钟
2. 倒去孔内液体，加入 100 $\mu$ L 生物素化抗体工作液，37 $^{\circ}$ C 孵育 60 分钟
3. 洗涤 3 次
4. 加入 100 $\mu$ L 酶结合物工作液，37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟
5. 洗涤 5 次
6. 加入 90 $\mu$ L 底物溶液，37 $^{\circ}$ C 孵育 15 分钟左右
7. 加入 50 $\mu$ L 终止液，立即在 450nm 波长处测量 OD 值
8. 结果计算

#### **问题分析**

若实验效果不好，请及时对显色结果拍照，保留所用板条及未使用试剂，并妥善保存，然后联系我公司技术支持为您解决问题。

我是按照实验步骤进行测定的，但是没有任何信号，为什么？

- ◆ 对于使用 HRP 底物的比色测定，终止液的加入会使底物变色。而说明书推荐的波长就是最适波长。
- ◆ 通过轻拍酶标板的边缘充分混合孔内试剂。加入终止液的时，颜色由蓝变黄（如果是 HRP 底物）。如果加终止液之前孔内试剂没有混合，则底物颜色变绿。
- ◆ 可能加入试剂的顺序错误。
- ◆ 加入底物溶液以后不要清洗酶标板。
- ◆ 在连续稀释时确定已经加入标准品。
- ◆ 如果底物系统中有两个成分，则必需混合均匀。
- ◆ 确定酶标仪的使用和操作正确。
- ◆ 确定试剂，标准品，样品都正确配制并按照说明滴加无误。



- ◆ 对于高敏感性试剂盒，确定使用的底物和放大剂都正确稀释。