鸡热休克蛋白 70(HSP-70)酶联免疫分析试剂盒使用说明书

产品编号：E0873Ch

www.eiaab.cn

本试剂盒仅供体外研究使用、不用于临床诊断!

预期应用

ELISA 法定量测定鸡血清、血浆、细胞培养上清或其它相关生物液体中热休克蛋白 70(HSP-70)含量。

实验原理

用纯化的抗体包被微孔板，制成固相载体，往包被抗 HSP-70 抗体的微孔中依次加入标本或标准品、生物素化的抗 HSP-70 抗体、HRP 标记的亲和素，经过彻底洗涤后用底物 TMB 显色。TMB 在过氧化物酶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 HSP-70 呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度（OD 值），计算样品浓度。

试剂盒组成及试剂配制

1. **酶联板：**一块（96 孔）
2. **标准品**（冻干品）：2 瓶，每瓶临用前以样品稀释液稀释至 1ml，盖好后静置 10 分钟以上，然后反复颠倒/搓动以助溶解，其浓度为 10 ng/ml，做系列倍比稀释(注：不要直接在板中进行倍比稀释)后，分别稀释 10 ng/ml，5 ng/ml，2.5 ng/ml，1.25 ng/ml，0.625 ng/ml，0.312 ng/ml，0.156 ng/ml，样品稀释液直接作为标准浓度 0 ng/ml，临用前 15 分钟内配制。
   如配制 5 ng/ml 标准品：取 0.5ml（不要少于 0.5ml）10 ng/ml 的上述标准品加入含有 0.5ml 样品稀释液的 Eppendorf 管中，混匀即可，其余浓度以此类推。
3. **样品稀释液：**1×20ml/瓶。
4. **检测稀释液 A：**1×10ml/瓶。
5. **检测稀释液 B：**1×10ml/瓶。
6. **检测溶液 A：**1×120ul/瓶（1:100）临用前以**检测稀释液 A** 1:100 稀释，稀释前根据预先计算好的每次实验所需的总量配制（每孔 100ul），实际配制时应多配制 0.1-0.2ml。如 10ul 检测溶液 A 加 990ul 检测稀释液 A 的比例配制，轻轻混匀，在使用前一小时内配制。
7. **检测溶液 B：**1×120ul/瓶（1:100）临用前以**检测稀释液 B** 1:100 稀释。稀释方法同检测溶液 A。
8. **底物溶液：**1×10ml/瓶。
9. **浓洗涤液：**1×30ml/瓶，使用时每瓶用蒸馏水稀释 25 倍。
10. **终止液：**1×10ml/瓶（2N H_2SO4）。
11. **覆膜：**1×5 张

标本的采集及保存

1. 血清：全血标本请于室温放置 2 小时或 4℃过夜后于 1000 x g 离心 20 分钟，取上清即可检测，或将标本放于-20℃或-80℃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° C 1000 x g 离心 15 分钟，或将标本放于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。

3. 细胞培养物上清或其它生物标本：请 1000 x g 离心 20 分钟，取上清即可检测，或将标本放于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。

注：以上标本置 4℃保存应小于 1 周，-20℃或-80℃均应密封保存，-20℃不应超过 3 个月，-80℃不应超过 6 个月；标本溶血会影响最后检测结果，因此溶血标本不宜进行此项检测；高血脂的标本不需进行特殊处理，可直接检测。

操作步骤

实验开始前，请提前配制好所有试剂；试剂或样品稀释时，均需混匀，混匀时尽量避免起泡。每次检测都应该做标准曲线。如样品浓度过高时，均应用样品稀释液进行稀释，以使样品符合试剂盒的检测范围。**建议各实验室在操作前先进行预实验以建立最佳稀释倍数**。

1. 加样：分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。空白孔加样品稀释液 100ul，余孔分别加**标准品**或待测样品 100ul，注意不要有气泡，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，酶标板加上盖或覆膜，37℃反应 120 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。每孔加**检测溶液 A 工作液** 100ul（在使用前一小时内配制），37℃,60 分钟。
3. 温育 60 分钟后，弃去孔内液体，甩干，洗板 3 次，每次浸泡 1-2 分钟，350ul/每孔，甩干（也可轻拍将孔内液体拍干）。
4. 每孔加**检测溶液 B 工作液（同检测 A 工作液）** 100ul，37℃，60 分钟。
5. 温育 60 分钟后，弃去孔内液体，甩干，洗板 5 次，每次浸泡 1-2 分钟，350ul/每孔，甩干（也可轻拍将孔内液体拍干）。
6. 依序每孔加**底物溶液** 90ul，37℃**避光显色**（30 分钟内，此时肉眼可见标准品的前 3-4 孔有明显的梯度兰色，后 3-4 孔梯度不明显，即可终止）。
7. 依序每孔加**终止溶液** 50ul，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液的加入顺序相同。为了保证实验结果的准确性，底物反应时间到后应尽快加入终止液。
8. 用酶联仪在 450nm 波长依序测量各孔的光密度（OD 值）。 在加终止液后立即进行检测。

注：

1. 每次实验留一孔作为空白调零孔（不同于空白孔），该孔不加任何试剂，只是最后加底物溶液及 2N H_2SO4。测量时先用此孔调 OD 值至零。
2. 严格按照规定的时间和温度进行温育以保证准确结果。所有试剂都必须在使用前达到室温。使用后立即冷藏保存试剂。
3. 洗板不正确可以导致不准确的结果。在加入检测溶液 B 或底物前确保尽量吸干孔内液体。为防止样品蒸发，试验时将反应板放于铺有湿布的密闭盒内，酶标板加上盖或覆膜，以避免液体蒸发；洗板后应尽快进行下步操作，避免酶标板长时间处于干燥状态。
4. 消除板底残留的液体和手指印，否则影响 OD 值。
5. 在储存和温育时避免强光直接照射。
6. 未使用完的酶标板或者试剂，请于 2-8℃保存。标准品、检测溶液 A 工作液、检测溶液 B 工作液请依据所需的量配置使用，请精确配置标准品及工作液，尽量不要微量配置（如吸取检测溶液 A 时，一次不要小于 10ul），以避免由于不准确稀释而造成的浓度误差；检测液 A、B，以及底物溶液在使用前，应置于 37℃温育 30 分钟；请勿重复使用已稀释过的标准品、检测溶液 A 工作液或检测溶液 B 工作液。
7. 建议检测样品时均设双孔测定，以保证检测结果的准确性。

洗板方法

手工洗板方法：吸去（不可触及板壁）或甩掉酶标板内的液体；在实验台上铺垫几层吸水纸，酶标板朝下用力拍几次；将推荐的洗涤缓冲液至少 0.3ml 注入孔内，浸泡 1-2 分钟，根据需要，重复此过程数次。

自动洗板：如果有自动洗板机，应在熟练使用后再用到正式实验过程中。

特异性

本试剂盒可同时检测重组或天然的鸡热休克蛋白 70(HSP-70)，且与其它相关蛋白无交叉反应。

计算

以标准物的浓度为横坐标（对数坐标），OD 值为纵坐标（普通坐标），在半对数坐标纸上绘出标准曲线（推荐使用专业制作曲线软件进行分析，如 curve expert 1.3），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. 洗涤过程非常重要，不充分的洗涤易造成假阳性。
2. 一次加样时间最好控制在 5 分钟内，如标本数量多，推荐使用多道移液器加样。
3. 请每次测定的同时做标准曲线，最好做复孔。
4. 如标本中待测物质含量过高，请先稀释后再测定，计算时请最后乘以稀释倍数。
5. 在配制标准品、检测溶液工作液时，请以相应的稀释液配制，不能混淆。
6. 底物请避光保存。

检测范围：0.156 ng/ml - 10 ng/ml

最低检测限：0.039 ng/ml

说明

1. 只有全部使用 **USCNLIFE** 试剂才能保证检测效果，因为所有试剂都是有关联的，不能混用其他制造商的产品。只有严格遵守 **USCNLIFE** 试剂的试验说明才会得到最佳的检测结果。
2. 在储存及孵育过程中避免将试剂暴露在强光中。所有试剂瓶盖须盖紧以防止蒸发和污染，试剂避免受到微生物的污染，因为蛋白水解酶的干扰将导致出现错误的结果。
3. 小心吸取试剂并严格遵守给定的孵育时间和温度。请注意在吸取标本 / 标准品，酶结合物或底物时，第一个孔与最后一个孔加样之间的时间间隔如果太大，将会导致不同的 “预孵育”时间，从而明显地影响到测量值的准确性及重复性。而且，洗涤不充分将影响试验结果。
4. 试剂盒保存：部分试剂保存于-20℃，部分试剂保存于 2-8℃，具体以标签上的标示为准。
5. 浓洗涤液会有盐析出，稀释时可在水浴中加温助溶。
6. 刚开启的酶联板孔中可能会含有少许水样物质，此为正常现象，不会对实验结果造成任何影响。
7. 中、英文说明书可能会有不一致之处，请以英文说明书为准。
8. 所有的样品都应管理好，按照规定的程序处理样品和检测装置。
9. 有效期：6 个月