

## EliKine™ 小鼠高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) ELISA 定量试剂盒 (一步法)

Cat #: KTE4078

Size: 48 T/96 T

|                                                                                   |                                                         |            |                                |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------|--------------------------------|
|  | 小鼠高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) ELISA 定量试剂盒 (一步法)                  |            |                                |
| <b>REF</b>                                                                        | 货号: KTE4078                                             | <b>LOT</b> | 批号: 见产品标签                      |
|                                                                                   | 检测范围: 1 ng/mL-80 ng/mL                                  |            | 灵敏度: 0.2 ng/mL                 |
|                                                                                   | 精密度: 板内变异系数<10%, 板间变异系数<10%                             |            | 回收率: 范围从 98%到 116%, 平均回收率 106% |
|                                                                                   | 特异性: 检测具有高灵敏度和优良的特异性。未观察到和小鼠高迁移率族蛋白 B1 类似物之间的显著交叉反应或干扰。 |            |                                |
|                                                                                   | 适用样本: 血清、血浆、组织、细胞上清及相关液体样本                              |            |                                |
|  | 保质期: 4°C, 避光保存 6 个月                                     |            |                                |

### 原理

EliKine™ 小鼠高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) ELISA 定量试剂盒 (一步法) 采用双抗体夹心法测定标本中 小鼠高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 水平。用抗小鼠高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 的特异性抗体包被于酶标板上, 将样品或标准品加入酶标板的孔中, 然后依次加入生物化的检测抗体和链霉亲和素-HRP, 形成抗体-抗原-抗体-酶复合物, 经过彻底洗涤后加入显色底物 (TMB), TMB 在 HRP 催化下呈现蓝色, 加终止液后变成黄色。用酶标仪在 450 nm 波长处测 OD 值, 小鼠高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 浓度与 OD450 值之间呈正比。

### 包装清单

| 试剂盒组分                            | 规格          |             | 储存条件      |
|----------------------------------|-------------|-------------|-----------|
|                                  | 48 T        | 96 T        |           |
| Mouse HMGB1 Microplate           | 48 wells    | 96 wells    | 4°C       |
| Mouse HMGB1 Standard (160 ng/mL) | 0.6 mL      | 0.6 mL      | 4°C       |
| Standard Diluent                 | 2 mL        | 2 mL        | 4°C       |
| Mouse HMGB1 Detect Antibody      | 0.7 mL      | 1.5 mL      | 4°C       |
| Streptavidin-HRP                 | 3 mL        | 6 mL        | 4°C       |
| HRP Substrate A                  | 3 mL        | 6 mL        | 4°C, 避光保存 |
| HRP Substrate B                  | 3 mL        | 6 mL        | 4°C, 避光保存 |
| Stop Solution                    | 3 mL        | 6 mL        | 4°C       |
| Wash Buffer                      | 20 mL (20×) | 20 mL (30×) | 4°C       |

|              |   |   |    |
|--------------|---|---|----|
| Plate Covers | 2 | 2 | 室温 |
|--------------|---|---|----|

## 自备耗材

- 酶标仪（能测 450 nm 处的吸光度）
- 多通道移液器或自动洗板机
- 恒温箱、低温离心机
- 可调节式移液枪及枪头
- 去离子水、PBS

## 试剂准备

**Standard Diluent:** 即用型；使用前，平衡到室温；4°C保存。Standard Diluent 用于稀释标准品。

**Mouse HMGB1 Standard:** 即用型；使用前，平衡到室温；4°C保存。

**Mouse HMGB1 Detect Antibody:** 即用型；使用前，平衡到室温；4°C保存。

**Streptavidin-HRP:** 即用型；使用前，平衡到室温；4°C保存。

**HRP Substrate A:** 即用型；使用前，平衡到室温；4°C避光保存。

**HRP Substrate B:** 即用型；使用前，平衡到室温；4°C避光保存。

**Stop Solution:** 即用型；使用前，平衡到室温；4°C保存。

**1×Wash Buffer:** Wash Buffer 使用前平衡到室温，48 T 用去离子水将 Wash Buffer 稀释 20 倍，96 T 用去离子水将 Wash Buffer 稀释 30 倍得到 1×Wash buffer。轻轻混合以避免起泡，室温保存，此溶液可稳定保存 30 天。

**标准曲线设置:** 按下表所示，用 Standard Diluent 将 160 ng/mL 标准品稀释为 80、40、20、10、5 和 0 ng/mL 的 Mouse HMGB1 标准品。

| 序号    | 标准品体积                      | Standard Diluent 体积 (μL) | 标准品浓度 (ng/mL) |
|-------|----------------------------|--------------------------|---------------|
| Std.1 | 150 μL of 160 ng/mL        | 150                      | 80            |
| Std.2 | 150 μL of Std.1 (80 ng/mL) | 150                      | 40            |
| Std.3 | 150 μL of Std.2 (40 ng/mL) | 150                      | 20            |
| Std.4 | 150 μL of Std.3 (20 ng/mL) | 150                      | 10            |
| Std.5 | 150 μL of Std.4 (10 ng/mL) | 150                      | 5             |
| Std.6 | 0                          | 150                      | 0             |

**注意：**每次实验都需要新配制标准品。

## 样本制备

1. 细胞培养上清：离心除去颗粒，立即测定或分装-20°C保存，避免反复冻融。
2. 血清：使用血清分离管，让样品在室温下凝结 30 min，然后 1,000 g 离心 15 min。取上层血清立即测定或分装-20°C保存，避免反复冻融。
3. 血浆：使用 EDTA、肝素或柠檬酸盐作为抗凝剂收集血浆。在收集后 30 min 内 1,000 g 离心 15 min。立即测定或分装-20°C保存，避免反复冻融。
4. 组织：称取 0.1 g 组织，加入 0.9 mL 冰预冷的 0.01M pH7.4 的 PBS（可加入蛋白酶抑制剂）冰浴匀浆，收集匀浆液 4°C，10,000 g 离心 10 min，取上清立即测定或分装-20°C保存，避免反复冻融。
5. 细胞：贴壁细胞用冷的 PBS 轻轻清洗，然后用胰蛋白酶消化，1,000 g 离心 5min 后收集细胞；悬浮细胞可直接离心收集。收集的细胞用冷的 PBS 洗涤 3 次。每 10<sup>6</sup> 个细胞中加入 150-200 μL PBS 重悬（推荐在 PBS 中加入蛋白酶抑制剂；若含量很低可减少 PBS 的体积）并通过冰浴超声破碎 2 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 12 次）。将提取液于 4°C，10,000 g 离心 10min，取上清立即测定或者分装-20°C保存，避免反复冻融。

6. 尿液、唾液等其他液体生物样本：3,000 g 离心 10min，取上清立即测定或者分装-20℃保存，避免反复冻融。

**注意：**不要使用严重溶血或脂血的标本。如果样品要在 24 h 内使用，则可以将其储存在 2 至 8℃，避免反复冻融。测定前，应将冷冻样品缓慢升至室温并轻轻混合。

## 实验步骤

1. 从板框上取下多余的板条，将它们放回装有干燥剂包的铝箔袋中，然后重新密封。
2. 加样：分别设空白孔（空白对照孔不加样品、Mouse HMGB1 Detect Antibody 及 Streptavidin-HRP，其余各步操作相同）、待测样品孔。在酶标包被板上待测样品孔中先加入 40 μL 样品，然后再加入 10 μL Mouse HMGB1 Detect Antibody。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。标准孔依次加入 50 μL 不同浓度的标准品。（注意：标准品中已经预加 Mouse HMGB1 Detect Antibody，无需再加。）
3. 加 HRP：每孔加入 50 μL Streptavidin-HRP，空白孔除外，给酶标板覆膜，在 37℃下孵育 30 min。
4. 除去每孔中的液体并洗涤。可使用多通道移液器或自动清洗机每孔加入 300 μL 1×Wash buffer 静置浸泡 30 s，进行洗涤，重复 5 次。在每个步骤中完全去除液体对于获得良好性能至关重要。最后一次洗涤后，倒置酶标板并用干净的纸巾吸干以除去任何剩余的 1×Wash buffer。洗板完成之后，请立即使用微孔板，不要让微孔板干燥。
5. 每孔先加入 50 μL HRP Substrate A，再加入 50 μL HRP Substrate B，轻轻震荡混匀，37℃避光显色 10 min。
6. 每孔加入 50 μL Stop Solution，Stop Solution 应按照与 HRP Substrate 相同的顺序加到板中。孔中的颜色应从蓝色变为黄色。如果孔中的颜色为绿色或颜色变化不均匀，请轻轻敲击板以确保彻底混合。
7. 在 15 min 内，测定每孔 450 nm 处的吸光值。

## 结果计算

1. 计算每个标准品和样品的复孔平均 OD 值，并减去空白孔平均 OD 值。
2. 标准曲线的绘制：以标准品浓度为 x 轴，各标准品的平均 ΔOD 值为 y 轴，绘制标准曲线。可以使用作图软件来创建标准曲线。将样品的 ΔOD 值代入曲线方程式，计算得出样品的浓度。

**注意：**如果样品被稀释，从标准曲线读取的浓度必须乘以稀释系数。

## 结果展示

典型标准曲线 ( $R^2 \geq 0.99$ )

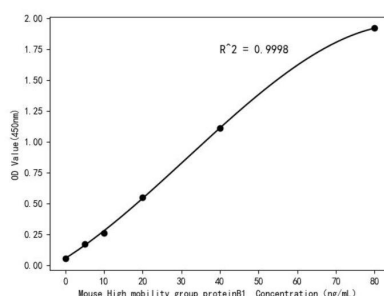


Figure1. 96 孔板分析的 Mouse HMGB1 标准曲线。数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线

## 注意事项

1. 如果 Standard Diluent 出现颜色变黄，少量沉淀等现象，是因为试剂中含有血清导致，离心去掉沉淀即可，不影响正常使用。
2. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
3. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。
4. 为确保准确的结果，在孵育步骤中必须正确粘附板贴。
5. Stop Solution 有一定的腐蚀性，操作时请做好防护措施。

常见问题

| 问题         | 原因              | 解决建议                                           |
|------------|-----------------|------------------------------------------------|
| 标准曲线非线性    | 加样不准            | 检查移液器                                          |
|            | 稀释不当            | 开管前轻柔搅拌和旋转标准品保存管使粉末完全溶解                        |
| 信号过低       | 样本孵育时间过短        | 确保足够的孵育时间；标准/样品孵育时间增加到 2 或 3 小时                |
|            | 试剂体积不足或稀释不当     | 检查移液器并确保准备充分                                   |
|            | TMB 孵育时间过短      | 加 Stop Solution 之前，确保有足够的孵育时间，直到出现蓝色           |
| 高背景/CV 值过高 | 洗板不充分           | 仔细检查清洗步骤。如果使用洗板机，检查所有接口                        |
|            | Wash Buffer 被污染 | 准备新鲜的 Wash Buffer                              |
| 低灵敏度       | 试剂盒保存不当         | HRP Substrate A 和 HRP Substrate B 注意避光保存，避免冷冻。 |
|            | 终止问题            | 测量读数前需在所有孔中加入 Stop Solution 终止                 |
| 稀释液沉淀      | 稀释液中有沉淀或凝结      | 稀释液缓慢加热至 37°C，沉淀可以复溶                           |

免责声明

本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

