



人热休克蛋白 70 定量分析酶联免疫检测试剂盒

本试剂盒仅供科研使用。用于体外定量检测人血清、血浆中的热休克蛋白 70 原浓度。**使用前请仔细阅读说明书并检查试剂组分是否完整。**如有产品包装破损或质量投诉，请在收到货一个月之内联系我们。

热休克蛋白 70 原简介：

热休克蛋白 70 (HSP70)，也叫做热休克蛋白 1A (HSPA1A)。是一个属于保护性热休克蛋白 70 家族的一员，分子量约 70 千道尔顿。HSP70 在各类细胞中都是丰富表达的保守蛋白。HSP70 蛋白的 N 端具有核苷酸结合且具 ATP 酶活性的结构，C 端底物结合结构域。人的 HSP70 与小鼠和大鼠的蛋白序列分别有 95%和 97%的同源性。

Hsp70 的核苷酸及底物结合结构协同起作用达到保护新生蛋白正确折叠，帮助折叠错误的蛋白或无功能重新正确折叠成有功能的蛋白。HSP70 能协助蛋白通过细胞膜，阻止蛋白的过度聚集，能协助过氧化物酶对错误的蛋白进行降解。在病理学方面，许多种的肿瘤中都观察到 HSP70 的增加。在一些神经组退化的病症中，也因协助错误折叠蛋白的再折叠而引起 HSP70 的积累，而观察到 HSP70 的大量升高。

检测原理：

本试剂盒采用双抗体夹心ELISA法检测样本中热休克蛋白70的浓度。热休克蛋白70捕获抗体已预包被于酶标板上，当加入标本或参考品时，其中的热休克蛋白70会与捕获抗体结合，其它游离的成分通过洗涤的过程被除去。当加入辣根过氧化物酶标记的抗人热休克蛋白70抗体后，抗人热休克蛋白70抗体与热休克蛋白70接合，形成夹心的免疫复合物，其它游离的成分通过洗涤的过程被除去。最后加入显色剂，若样本中存在热休克蛋白70将会形成免疫复合物，辣根过氧化物酶会催化无色的显色剂氧化成蓝色物质，在加入终止液后呈黄色。通过酶标仪检测，读其450nm处的OD值，热休克蛋白70浓度与OD₄₅₀值之间呈正比，通过参考品绘制标准曲线，对照未知样本中OD值，即可算出标本中热休克蛋白70浓度。

人热休克蛋白70定量分析酶联免疫检测试剂盒组成：

| 组分 | 规格 (96T/48T) |
|--------------|--------------|
| 人热休克蛋白70预包被板 | 12条/6条 |
| 标准品稀释液 | 10ml/5ml |
| 人热休克蛋白70标准品 | 2支/1支(冻干)* |
| 抗体HRP结合物 | 10ml/5ml |
| 浓缩洗涤液 20× | 30ml/15ml |
| TMB底物 | 10ml/5ml |
| 中止液 | 5ml/3ml |
| 封板胶纸 | 3/2张 |
| 说明书 | 1份 |

标本收集：

1. 标本的收集请按下列流程进行操作：
 - A. 细胞上清标本离心去除悬浮物后即可；
 - B. 血清标本应是自然凝固后，取上清，避免在冰箱中凝固血液；
 - C. 血浆标本，推荐用EDTA的方法收集若待测样本不能及时检测，
 - D. 标本收集后请分装，冻存于-20℃，避免反复冻融。
2. 血清标本不应添加任何防腐剂或抗凝剂；
3. 标本应清澈透明，检测前样本中如有悬浮物应通过离心去除。
4. 请勿使用溶血，高血脂或污染的标本检测，否则结果将不准确。

注意事项：

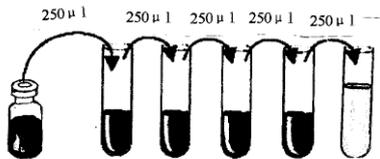
1. 试剂盒请保存在2~8℃。



2. 浓缩洗涤液因在低温下可能有结晶，请水浴加热使结晶完全溶解后再配制工作液。
3. 标准品复溶加样后，剩余部份请丢弃。
4. 底物请勿接触氧化剂和金属。
5. 加样时，请及时更换枪头，避免交叉污染。
6. 严禁混用不同批号的试剂盒组份。
7. 充分混匀对保证反应结果的准确性很重要，在加液后请轻轻叩击边缘以保证混匀。
8. 室温反应，请严格控制在25~28℃。
9. 洗涤过程是至关重要的，洗涤不充分会使精确度下降并导致结果误差较大。
10. 试验中标准品和样本检测时建议作双复孔。
11. 加样过程中避免气泡的产生。

检测前准备工作：

1. 试剂盒自冰箱中取出后应置室温（25~28℃）平衡20分钟；每次检测后剩余试剂请及时于2~8℃保存。
2. 将浓缩洗涤液用双蒸水或去离子水稀释（1份加19份水）。
3. 将检测抗体用检测抗体稀释液按标识提前10分钟配制成工作浓度；
3. 如有5X准品稀释液，请按所需量用双蒸水或去离子水稀释（1份加4水）。
4. 标准品：按标签复溶体积加入标准品稀释液复溶使热休克蛋白70终浓度达到1000ng/ml，室温反应，请严格控制在25~28℃，静置10~15分钟后轻轻混悬（建议抽吸几次）待彻底溶解，用标准品稀释液倍比梯度稀释后依次加入检测孔中。（标准曲线取七个点，最高浓度为1000ng/ml，标准品稀释液直接加入作为0浓度。）下图为标准品稀释示意图。



洗涤方法：

自动洗板机或人工洗板：每孔洗涤液为300u1，注入与吸出间隔15-30秒。洗板5次。最后一次洗板完成后将板倒扣着在厚吸水纸上用力拍干。

实验过程需自备的材料：

1. 不同规格的加样枪及相应的枪头；
2. 酶标仪；
3. 自动洗板机；
4. 去离子水或双蒸水；

操作步骤：

1. 通过计算并确定一次性实验所需的板条数，取出所需板条放置在框架内，暂时用不到板条请放回铝箔袋密封，保存于4℃。
2. 建议设置本底校正孔，即空白孔，设置方法为该孔只加TMB显色液和终止液。每次实验均需做标准品对照并画出标准曲线。
3. 分别将稀释好的标本或不同浓度标准品（100u1/孔）加入相应孔中，用封板胶纸封住反应孔，37℃孵育120分钟。
4. 洗板5次，且最后一次置厚吸水纸上拍干。
5. 每孔加入HRP抗体结合物工作液（100u1/孔）。用封板胶纸封住反应孔，37℃孵育60分钟。
6. 洗板5次，且最后一次置厚吸水纸上拍干。
7. 加入显色剂TMB100u1/孔，避光室温（25~28℃）孵育20分钟。
8. 加入终止液50u1/孔，混匀后即刻测量OD₄₅₀值。

结果判断：

1. 复孔的值在20%的差异范围内结果才有效，复孔的值平均后可作为测量值。
2. 每个标准品或标本的OD值应减去本底校正孔的OD值。



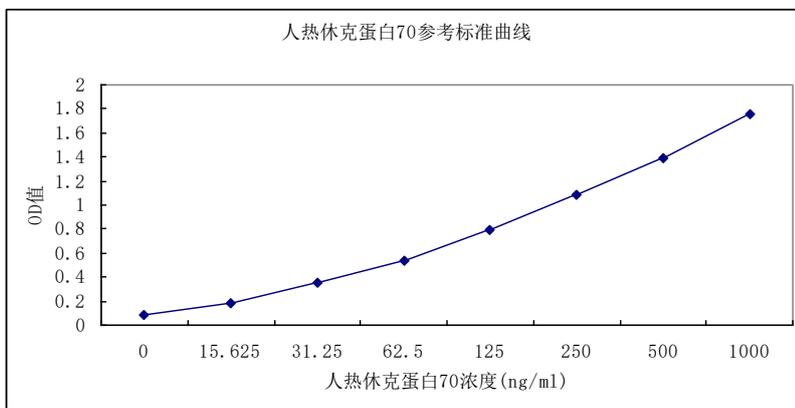
3. 手工绘制标准曲线。以标准品浓度作横坐标，OD值作纵坐标，以平滑线连接各标准品的坐标点。通过标本的OD值可在标准曲线上查出其浓度。

4. 若标本 OD 值高于标准曲线上限，应当适当稀释后重测，计算浓度时应乘以稀释倍数

典型数值和参考曲线

| 浓度ng/ml | 典型OD值1 | 典型OD值2 | OD平均值 |
|---------|--------|--------|-------|
| 0 | 0.094 | 0.07 | 0.082 |
| 15.625 | 0.211 | 0.151 | 0.181 |
| 31.25 | 0.379 | 0.335 | 0.357 |
| 62.5 | 0.584 | 0.5 | 0.542 |
| 125 | 0.836 | 0.756 | 0.796 |
| 250 | 1.152 | 1.024 | 1.088 |
| 500 | 1.435 | 1.345 | 1.39 |
| 1000 | 1.857 | 1.665 | 1.761 |

人热休克蛋白70参考标准曲线



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标本含量。

灵敏度，特异性和重复性：

- 灵敏度：多次重复结果表明，最小检出量为7.2ng/ml。
- 特异性：与人的GRP-78、HSPA2、HSPA6、HSPA8等没有交叉反应。
- 重复性：板内，板间变异系数均<10%。

参考文献：

- Gaudio, E. et al. (2013) Blood 121:351.
- Liu, M. et al. (2008) J. Biol. Chem. 283:35783.
- Cho, H.S. et al. (2012) Nat. Commun. 3:1072.
- Wang, A.M. et al. (2013) Nat. Chem. Biol. 9:112.
- Wu, F.H. et al. (2012) Cancer Lett. 317:157.
- McDonough, H. & C. Patterson (2003) Cell Stress Chaperones 8:303.