大鼠70kDa热休克蛋白5(HSPA5)
酶联免疫吸附测定试剂盒

本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断

使用说明书

- **货号**：JL15715
- **检测范围**：0.78-50ng/mL
- **规格**：5×96T/96T/48T
- **保存温度**：2-8℃
- **种属**：大鼠
- **有 效 期**：6个月

HSPA5 简介：

70kDa热休克蛋白（HSPA5）也被称为（GRP-78）或5结合免疫球蛋白（BiP）或（Byun1），是一种由HSPA5基因编码的蛋白质。BiP是一种位于内质网（ER）腔内的HSP70分子伴侣，当新合成的蛋白质被转运到ER时，它与之结合，并将其保持在能够进行后续折叠和寡聚的状态。BiP也是易位机制的一个重要组成部分，并在逆向运输穿越ER膜的异常蛋白中发挥了作用，这些蛋白注定要被蛋白体降解。BiP在所有的生长条件下都是一种丰富的蛋白质，但在导致未折叠多肽在ER中积累的条件下，其合成被明显诱导。

实验原理：

本试剂盒采用双抗体夹心法酶联免疫吸附试验（ELISA）。往预先包被有大鼠70kDa热休克蛋白5(HSPA5)捕获抗体的微孔中，依次加入样本、标准品、生物素标记的检测抗体，HRP酶结合物，中间经过温育和洗涤，用底物TMB显色，TMB在过氧化物酶(HRP)的催化下转化成蓝色，并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样本中的大鼠70kDa热休克蛋白5(HSPA5)呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度（OD值），计算样本浓度。

灵敏度：0.4ng/mL

特异性：可检测样本中大鼠的HSPA5，且与其类似物无明显交叉反应。

注意事项:

1. 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 20-25℃。使用后立即冷藏试剂。
2. 洗板不正确可能导致不准确的结果。在加入底物前确保尽量吸干孔内液体。整个过程中不要让微孔干燥时间过长。
3. 清洁板底残留的液体和手指印，否则影响 OD 值。
4. 底物显色液应呈无色的颜色，已经变蓝的底物液不能使用。
5. 避免试剂和样本的交叉污染以免造成错误结果。
6. 在储存和温育时避免强光直接照射。
7. 任何反应试剂不能接触漂白溶剂或漂白溶剂所散发的强烈气体。任何漂白成分都会破坏试剂盒中试剂的生物活性。
8. 不能使用过期产品，不同货号和批号组分不得混用。
9. 试剂盒以外来源的重组蛋白可能会出现与本试剂盒抗体不匹配而不被识别的情况。
10. 如果可能传播疾病，所有的样本都应管理好，按照规定的程序处理样本和检测装置。

试剂盒组成：

名称	5×96孔配置	96孔配置	48孔配置	备注
预包被 96 孔酶标板 Pre-coated Assay Plate	5×8 孔×12 条	8 孔×12 条	8 孔×6 条	无
标准品 Standard	10 支	2 支	1 支	按说明书进行稀释
通用稀释液 Universal Diluent	10×20mL	2×20mL	1×20mL	无
浓缩生物素化检抗 100× Biotin-antibody (100×)	5×120μL	120μL	60μL	按说明书进行稀释
浓缩酶结合物 100× Streptavidin-HRP (100×)	5×120μL	120μL	60μL	按说明书进行稀释
20×洗涤液 Wash Buffer (20×)	10×10mL	2×10mL	1×10mL	按说明书进行稀释
底物（TMB） TMB Substrate	5×10mL	10mL	5mL	无
终止液 Stop Solution	5×6mL	6mL	3mL	无
封板膜 Plate Sealer	20 张	4 张	4 张	无
说明书 Instruction Manual	1 份	1 份	1 份	无

样本处理及要求：

1. **试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围**，建议实验前通过相关文献预估样本中待测物的浓度并通过预实验确定样本的实际浓度。如果样本中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
2. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议做预实验验证其检测有效性。
3. **血清**：将收集于血清分离管的全血样本在室温放置2小时或2-8℃过夜，然后1000×g离心20分钟，取上清即可，或将上清置于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。
4. **血浆**：用EDTA或肝素作为抗凝剂采集样本，并将样本在采集后的30分钟内于2-8℃1000×g离心15分钟，取上清即可检测，或将上清置于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。
5. **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检测结果），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的组织样本对应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，于冰上充分研磨或匀浆机研磨。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。
6. **细胞培养物上清**：请1000×g离心20分钟，取上清即可检测，或将上清

置于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。

7. **细胞裂解液**：贴壁细胞用预冷PBS轻轻清洗，然后用胰蛋白酶消化，1000×g离心5分钟后收集细胞；悬浮细胞可直接离心收集。收集的细胞用预冷PBS清洗3次，每1×10^6个细胞中加入150-200μL PBS重悬（推荐在PBS中加入蛋白酶抑制剂；若含量很低可适当减少PBS体积）并通过反复冻融或超声使细胞破碎。将提取液于2-8℃，1500×g离心10分钟，取上清检测。
8. **其它生物样本**：1000×g离心20分钟，取上清即可检测。
9. **样本外观**：样本应清澈透明，悬浮物应离心去除。
10. **样本保存**：样本收集后若在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，样本溶血会影响最后检测结果，因此溶血样本不宜进行此项检测。

样本稀释方案：

请提前预估样本的浓度范围，如果您的检测样本需要稀释，参考稀释方案如下：

稀释 100 倍：一步稀释。取 5μL 样本到 495μL 通用稀释液内，做 100 倍稀释；

稀释 1000 倍：两步稀释。取 5μL 样本到 95μL 通用稀释液内，做 20 倍稀释，再取 5μL 20 倍稀释样本到 245μL 通用稀释液内，做 50 倍稀释，总共稀释 1000 倍；

稀释 100000 倍：三步稀释。取 5μL 样本到 195μL 通用稀释液内，做 40 倍稀释，再取 5μL 40 倍稀释样本到 245μL 通用稀释液内，做 50 倍稀释，最后取 5 μL 2000 倍稀释样本到 245μL 通用稀释液内，做 50 倍稀释，总共稀释 100000 倍；

每步稀释时取液量不少于 **3μL**，稀释倍数不超过 **100 倍**。每步稀释都需混合均匀，避免起泡。

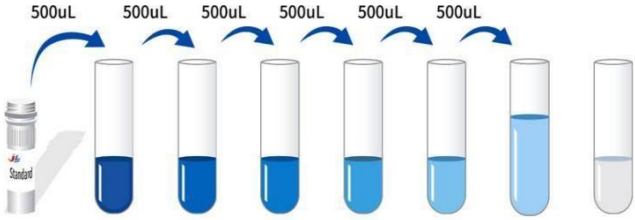
实验所需自备试验器材：

1. 酶标仪（450nm）
2. 高精度移液器及吸头：0.5-10μL、5-50μL、20-200μL、200-1000μL
3. 37℃恒温箱
4. 蒸馏水或去离子水

检测前准备工作：

1. 请提前 10 分钟从冰箱中取出试剂盒，平衡至室温。
2. **标准品梯度工作液配制**：加入 1mL 通用稀释液至冻干标准品中，静置15分钟待其完全溶解后轻轻混匀(浓度为50ng/mL)，然后按照以下浓度：50ng/mL、25ng/mL、12.5ng/mL、6.25ng/mL、3.12ng/mL、1.56ng/mL、0.78ng/mL、0ng/mL进行稀释。

   倍比稀释方法：取7支EP管，每管中加入500μL通用稀释液,50ng/mL 的标准品工作液中吸取500μL到第一支EP管中混匀配成25ng/mL 的标准品工作液，按此步骤往后依次吸取混匀。最后一管直接作为空白孔，不需要再从倒数第二管中吸取液体，具体如下图。



ng/mL	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0

3. **生物素化检抗工作液配制**：使用前15分钟将100×浓缩生物素化检抗于1000×g离心1分钟，以通用稀释液将100×浓缩生物素化检抗稀释成1×工作浓度(例：10μL浓缩液+990μL通用稀释液)，现配现用。
4. **酶结合物工作液配制**：使用前15分钟将100×浓缩酶结合物于1000×g离心1分钟，以通用稀释液将100×浓缩酶结合物稀释成1×工作浓度(例：10μL浓缩液+990μL通用稀释液)，现配现用。
5. **1×洗涤液配制**：取10mL 20×洗涤液到190mL蒸馏水中（从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶，属于正常现象，可放置室温，待结晶完全溶解后再配制)。

操作步骤：

1. 从室温平衡10分钟后的铝箔袋中取出所需板条，剩余板条用自封袋密封放回4℃。

2. 加样：分别将样本或不同浓度标准品按照100μL每孔加入相应孔中，空白孔加入100μL通用稀释液。盖上封板膜后37℃温育60分钟。（**建议：将待测样本用通用稀释液最低稀释1倍后再加入酶标板内测试。**从而减少基质效应对测试结果的影响，最后计算样本浓度时需乘以对应的稀释倍数。所有的待测样本和标准品在检测中建议设立复孔）。

3. 加生物素化检抗：取出酶标板，弃去液体，不用洗涤。每孔直接加入100μL生物素化检抗工作液，盖上封板膜后37℃温育60分钟。

4. 洗板：弃去液体，每孔加入300μL 1x洗涤液，静置1分钟，甩去洗涤液，吸水纸上拍干，如此重复洗板3次（也可用洗板机洗板）。

5. 加酶结合物工作液：每孔加入100μL酶结合物工作液，盖上封板膜后37℃温育30分钟。

6. 洗板：弃去液体按步骤4洗涤方法，洗板5次。

7. 加底物：每孔加入90μL底物(TMB)，盖上封板膜，37℃避光温育15分钟。

8. 加终止液：取出酶标板，每孔直接加入50μL终止液，立即在450nm波长处测定各孔的OD值。

实验结果计算：

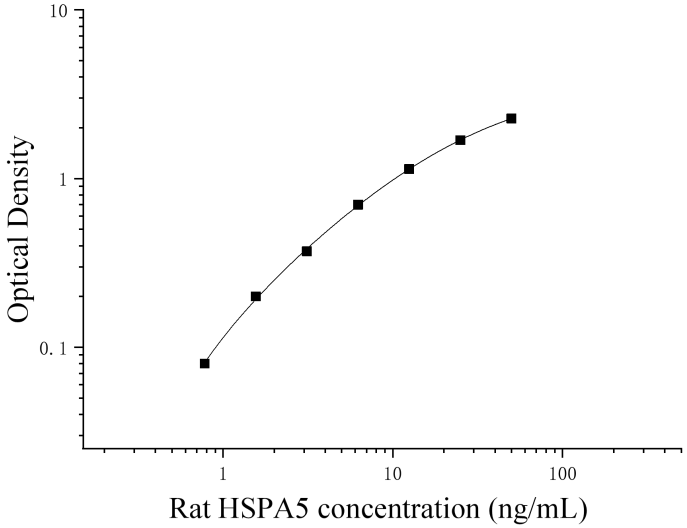
结果判断：

1. 计算标准品和样本复孔的平均 OD 值并减去空白孔的 OD 值作为校正值。以浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，在双对数坐标纸上绘出四参数逻辑函数的标准曲线。
2. 若样本 OD 值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测并在计算样本浓度时乘以相应的稀释倍数。

典型数据和参考曲线：

以下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。

浓度(ng/mL)	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0
OD 值	2.36	1.78	1.23	0.79	0.46	0.29	0.17	0.09
校正 OD 值	2.27	1.69	1.14	0.7	0.37	0.2	0.08	-



注意：本图仅供参考，应以每次实验数据所绘制标准曲线计算样本含量。

试剂盒性能：

1. 重复性：板内变异系数小于 10%，板间变异系数小于 10%。
2. 回收率：在选取的健康大鼠组织匀浆和细胞培养上清中加入 3 个不同浓度水平的大鼠HSPA5，计算回收率。

样本类型	范围（%）	平均回收率（%）
组织匀浆(n=8)	92-105	102
细胞裂解液(n=8)	96-108	105

3. 线性稀释：分别在选取的4份健康大鼠组织匀浆和细胞培养上清中加入高浓度大鼠HSPA5，在标准曲线动力学范围内进行稀释，评估线性。

稀释比例	回收率（%）	组织匀浆	细胞裂解液
1：2	范围	88-96	90-110
	平均回收率	93	96
1：4	范围	87-108	105-115
	平均回收率	98	108

问题分析：

若实验效果不好，请及时对显色结果拍照，保存实验数据，保留所用板条及未使用试剂，然后联系我公司技术支持为您解决问题。同时您也可以参考以下资料：

问题描述	可能原因	相应对策
标曲线性差	标准品稀释不正确	确保标准品按照推荐方法溶解和稀释
	移液不准确	定期校准移液器并检查枪头密封性
	反应液蒸发	用封板膜密封酶标板
	洗板不彻底	足够的洗涤次数和加入足量洗涤液
	孔底有异物	读数前清洁板底
显色弱或无色	孵育时间不够	确保孵育时间
	孵育温度不正确	按推荐温度孵育
	试剂体积添加不足	检查移液器并严格按照操作步骤操作
	稀释不正确	检查试剂稀释步骤
	酶结合物失活	混合酶结合物和底物，通过显色反应检查

OD 值低	酶标仪设置不正确	检查仪器波长
	没加终止液	加入适量终止液
	读板时等待时间太长	及时读板
	样本含量过高	通过预实验确定合适的稀释倍数
	样本含量过低	通过预实验确定合适的稀释倍数
背景高	显色液被污染	更换显色液
	显色时间太长	控制显色时间
	检抗或酶结合物稀释错误	使用推荐稀释方法
	洗板不彻底	足够的洗涤次数和加入足量洗涤液

参考文献：

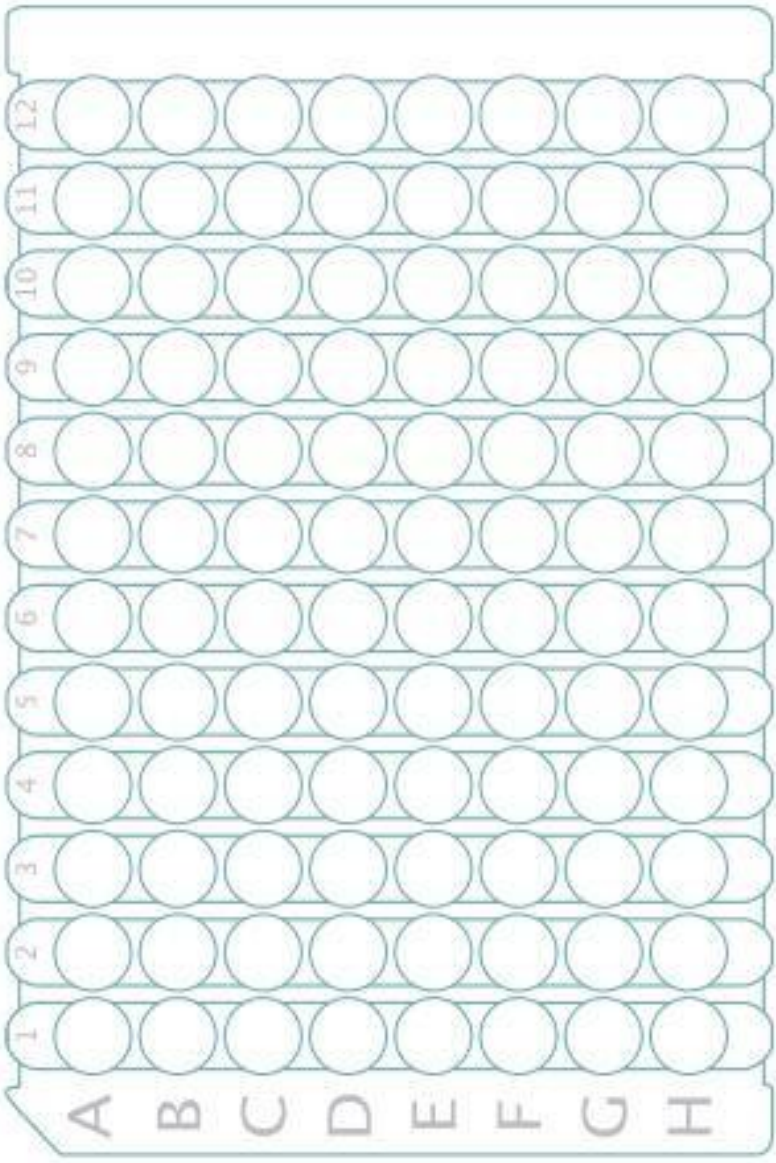
1. Yang J, Nune M, Zong Y, Zhou L, Liu Q (Dec 2015).Structure. 23 (12): 2191–203.

2. Mayer MP, Bukau B (Mar 2005).Cellular and Molecular Life Sciences. 62 (6): 670–84.

3. Wisniewska M, Karlberg T, Lehtiö L, Johansson I, Kotenyova T, Moche M, Schüler H (2010-01-01).PLOS ONE. 5 (1): e8625.

4. Leu JI, Zhang P, Murphy ME, Marmorstein R, George DL (Nov 2014).ACS Chemical Biology. 9 (11): 2508–16.

5. Fu HY, Minamino T, Tsukamoto O, Sawada T, Asai M, Kato H, Asano Y, Fujita M, Takashima S, Hori M, Kitakaze M (September 2008).Cardiovascular Research. 79 (4): 600–10.


12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
A
B
C
D
E
F
G
H

咨询电话：400-0066-400

传　　真：021-55660885

电子邮箱：shjlsw@163.com

网　　址：www.jonln.com