

**Human Total HSP27 ELISA
Kit**

目录号

CHE0191

CHE0191

规格

96 Tests

48 Tests



Human Total HSP27 ELISA Kit

本试剂盒用于定量检测人细胞裂解液样本中 Total HSP27 浓度。**使用前请仔细阅读说明书并检查试剂组分**，如有任何疑问请与北京四正柏生物科技有限公司联系，公司将为您提供强有力的技术支持。

仅供研究，不用于临床诊断。

目录

简介.....2

检测原理.....4

试剂盒组成.....5

储存条件.....6

其它实验材料.....7

注意事项.....7

样品收集、处理及保存方法.....9

试剂准备.....9

操作步骤.....11

操作流程圖.....12

操作要点提示.....13

结果判断.....13

结果重复性.....15

灵敏度.....15

特异性.....16

常见问题分析及解决办法.....17

相关产品.....19

参考文献.....20

实际加样情况表.....22

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

实际加样情况表

浓缩生物素化抗体稀释方法

所用板条数	浓缩生物素化抗体	+	生物素化抗体稀释液
12	110μL	+	10890μL
10	90μL	+	8910μL
8	70μL	+	6930μL
6	50μL	+	4950μL
4	33μL	+	3267μL
2	17μL	+	1683μL
1	9μL	+	891μL

浓缩酶结合物稀释方法

所用板条数	浓缩酶结合物	+	酶结合物稀释液
12	110μL	+	10890μL
10	90μL	+	8910μL
8	70μL	+	6930μL
6	50μL	+	4950μL
4	33μL	+	3267μL
2	17μL	+	1683μL
1	9μL	+	891μL

简介：

热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)于20世纪60—70年代由科学家Tissières在暴露于亚致死温度(20~35℃)下的三龄果蝇幼虫唾液腺中发现并鉴定。正常生理条件下, HSPs表达较低, 高温、缺氧、缺血、饥饿、创伤、紫外线、毒素侵袭等 应激条件下在细胞内合成, 又叫应激蛋白(stress protein, SP)。HSPs除调节热休克反应外, 在细胞中还具有多种功能, 如调控细胞生长、细胞骨架的聚集, 辅助蛋白质的合成与折叠, 调节信号通路及免疫反应, 在细胞受损时对细胞起到一定的内源性保护作用。HSPs按分子质量不同分为以下几类: HSPH(HSP110)、HSPC(HSP90)、HSPA(HSP70)、DNAJ(HSP40)、小分子热休克蛋白HSPB家族(small HSP)和人类分子伴侣家族(HSP60 和CCT)。HSPB亚型之一的HSPB1在20世纪80年代晚期被首次提纯和鉴定, 是一种有效的抗凋亡和抗氧化多肽, 也是F-actin动力学的关键调制器, 其基因序列可于多种哺乳动物体内表达, 在人体内的基因产物是热休克蛋白27(heat shock proteins27, HSP27)。HSPB1的基因序列里含有 热休克调节元件(heat shock element, HSE), 可以与热休克反应因子(heat shock factor, HSF)结合, 激活HSP27在应激条件下的表达上调。近年来, HSP27在多种肠道疾病中表达升高, 可能与相关肠道疾病的发生、发展、治疗及预后等密切相关。

20世纪80年代, 在高温孵育的HeLa细胞中发现某种分子质量为27kd的蛋白质合成增加, 学者们将其命名为人HSP27。HSP27 从氨基末端

到羧基末端依次由以下结构组成：包含WDPF结构域的氨基酸残端、含有氨基酸序列 PSRLFDQXFGEXLL的保守域、 α 晶体蛋白结构域 (α -crystallin)、羧基末端灵活结构域。氨基末端有多种起调控作用的结构域，是HSP27的结构基础，含有非保守性和疏水性的WDPF结构域，可调节HSP27的寡聚化。丝氨酸位点Ser15、Ser78及Ser82位于N末端，是HSP27磷酸化的主要位点。

HSPs能够通过协助蛋白质的运输、折叠和合成等来保证蛋白正确结构的形成，与依靠三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)产生作用的大分子量HSPs不同的是，HSP27 主要通过自身磷酸化起作用。

HSP27的基本作用是在各种应激条件下发挥其作为“分子伴侣”的功能，调节蛋白质的合成、折叠、伸展、转运、定位，以及寡聚体的形成和解聚，清除错误折叠的蛋白，防止蛋白凝集，促进蛋白复性，以保持蛋白的稳定性，增强生物细胞对各种外来刺激的抵抗力，起到细胞保护作用。

HSP27主要以其磷酸化的活性形式发挥效应，具有伴侣活性、耐热性、抗氧化、抑制细胞凋亡等多种重要生物学功能。HSP27被发现在多种肠道疾病中表达水平升高。

参考文献:

1. HSP27 expression in the human peripheral blood mononuclear cells as an early prognostic biomarker in coronary artery disease patients. Abaspour AR, et al. Diabetes Metab Syndr, 2019 May - Jun.
2. Silencing of heat shock protein 27 increases the radiosensitivity of non-small cell lung carcinoma cells. Xu L, et al. Mol Med Rep, 2019 Jul.
3. Local unfolding of the HSP27 monomer regulates chaperone activity. Alderson TR, et al. Nat Commun, 2019 Mar 6.
4. Hsp27 Responds to and Facilitates Enterovirus A71 Replication by Enhancing Viral Internal Ribosome Entry Site-Mediated Translation. Dan X, et al. J Virol, 2019 May 1.
5. Characterization of heat shock protein 27 in extracellular vesicles: a potential anti-inflammatory therapy. Shi C, et al. FASEB J, 2019 Feb.

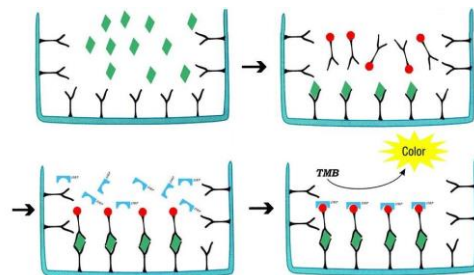
相关产品:

目录号	产品名称	目录号	产品名称
CHE0101	Human IL-1 α ELISA Kit	CHE0029	Human TGF- β 1 ELISA Kit
CHE0001	Human IL-1 β ELISA Kit	CHE0103	Human MCP-1 ELISA Kit
CHE0003	Human IL-2 ELISA Kit	CHE0044	Human EGF ELISA Kit
CHE0027	Human IL-2sR α ELISA Kit	CHE0025	Human G-CSF ELISA Kit
CHE0028	Human IL-3 ELISA Kit	CHE0026	Human GM-CSF ELISA Kit
CHE0005	Human IL-4 ELISA Kit	CHE0052	Human sICAM-1 ELISA Kit
CHE0006	Human IL-5 ELISA Kit	CHE0053	Human Leptin ELISA Kit
CHE0009	Human IL-6 ELISA Kit	CHE0043	Human VEGF ELISA Kit
CHE0011	Human IL-8 ELISA Kit	CHE0060	Human FGF basic ELISA Kit
CHE0012	Human IL-9 ELISA Kit	CHE0105	Human MMP-9 ELISA Kit
CHE0013	Human IL-10 ELISA Kit	CHE0107	Human TIMP-1 ELISA Kit
CHE0016	Human IL-12p40 ELISA Kit	CHE0112	Human GDF-15 ELISA Kit
CHE0015	Human IL-12p70 ELISA Kit	CHE0059	Human TSLP ELISA Kit
CHE0055	Human IL-15 ELISA Kit	CHE0035	Human Resistin ELISA Kit
CHE0054	Human IL-17 ELISA Kit	CHE0021	Human Adiponectin ELISA Kit
CHE0056	Human IL-21 ELISA Kit	CHE0033	Human Proinsulin ELISA Kit
CHE0057	Human IL-22 ELISA Kit	CHE0085	Human IL-24/MDA-7 ELISA Kit
CHE0058	Human IL-32 α ELISA Kit	CHE0086	Human PBEF ELISA Kit
CHE0017	Human IFN- γ ELISA Kit		
CHE0019	Human TNF- α ELISA Kit		
CHE0024	Human APO-1/FAS ELISA Kit		

如需其它试剂盒，请致电四正柏生物！

检测原理:

本实验采用双抗体夹心 ELISA。用抗人 Total HSP27 单克隆抗体预包被酶标板，加入适度稀释的样本和标准品，其中的 Total HSP27 会与其单抗结合，洗去游离成分；加入生物素化的抗人 Total HSP27 抗体，抗人 Total HSP27 抗体与结合在单抗上的人 Total HSP27 结合而形成免疫复合物，洗去游离的成分；加入辣根过氧化物酶标记的亲合素，生物素与亲合素特异性结合，洗去未结合的酶结合物；加入显色剂，若反应孔中有 Total HSP27，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 下测 OD 值，Total HSP27 浓度与 OD450 值之间呈正比，可通过绘制标准曲线计算出标本中 Total HSP27 浓度。



检测原理示意图

试剂盒组成:

试剂盒组成	96t	48t	配制
1a 标准品	2 支	1 支	按说明书进行稀释
1b 标准品和标本稀释液	1 瓶	1 瓶	即用型
2a 浓缩生物素化抗体	2 支	1 支	按瓶签标识进行稀释
2b 生物素化抗体稀释液	1 瓶	1 瓶	即用型
3a 浓缩酶结合物（避光）	2 支	1 支	按瓶签标识进行稀释
3b 酶结合物稀释液	1 瓶	1 瓶	即用型
4 浓缩洗涤液 20×	1 瓶	1 瓶	按瓶签标识进行稀释
显色剂（避光）	1 瓶	1 瓶	即用型
终止液	1 瓶	1 瓶	即用型
抗体包被板条	8×12	8×6	即用型
封板胶纸	4 张	2 张	即用型
说明书	1 份	1 份	

问题	可能原因	解决办法
全部板子变成规则的蓝色	不充分的洗涤/洗涤步骤被遗漏使没结合的 HRP 仍有残留	最好使用洗板机充分洗涤
	太多的酶结合物	检查每孔是否有残留的洗涤或加样量是否准确
	封板膜或试剂容器被重复使用, 导致 HRP 残留, 使 TMB 底物产生非特异蓝色	检查稀释度, 必要时进行效价测定
		使用新封板膜, 每步使用不同的试剂容器
高 CV 值花板	操作不慎或洗涤不充分	按说明书洗板、加样和显色, 洗板尤为重要
	出现干板, 没有使用封板膜、封板膜重复使用	确定每两步骤间酶标板应保持湿润 使用封板膜封口, 注意每步使用新鲜的封板膜
	移液器不准确, 吸头重复使用	检查并校准移液器, 每次取样必须更换吸头
标准曲线可得到, 但两点之间区别很差(低或平的曲线)	酶结合物不足	检查稀释度, 必要时进行效价测定
	检测抗体不足	检查稀释度, 必要进行效价测定
	板子显色不足	延长底物孵育时间
		使用推荐品牌的底物溶液
标准曲线很好, 但没有任何期望的阳性信号	标本中无相应的待检测物质	使用内参对照
	标本基质遮盖检测	重复实验, 重新考虑实验的相应参数 将标本至少做 1:2 相应的稀释, 或进行系列稀释
标准曲线很好, 但标本的判读值很高	标本中含的待检物质水平超过实验范围	稀释标本
边缘效应	工作环境温度不均衡	避免将板子在变化温度环境中孵育
漂移	实验过程中出现间断	整个实验应连续操作, 在实验开始前将所有的标准品和标本做适当的准备。
	试剂没有按说明书平衡至室温	在所有试剂加入孔前, 确保它们已平衡至室温, 除非说明书中有另外的要求。
是否可更改试剂盒所提供的操作步骤?		一般厂商为确保最高的灵敏度, 对试剂盒都进行了优化, 为确保每一试剂盒实验的规范性应按说明书操作。
是否可混用不同批次试剂盒中的试剂?		不可以, 绝大多数试剂在每批试剂盒中是特异的, 若有问题可与厂家或代理商联系。
是否可增加或减少标本的体积?		商品化的试剂盒所需加入的标本体积是优化的, 应按说明书操作, 不建议更改所加标本体积。
是否可重新确定自己的标准曲线的点?		可以。说明书上有建议制备标准曲线时标准品的稀释度, 可改变稀释倍数和增加曲线的点, 但是必须在实验范围内, 高于试剂盒中最高标准品的点和低于灵敏度以下的点是无效的。

ELISA检测常见问题分析及解决办法：

问题	可能原因	解决办法
无颜色	不同试剂盒或不同批号的试剂混合	重新检查试剂的标签，确保所有组分都属于正使用的试剂盒中的。不能混用不同试剂盒或不同批号的试剂。
	漏加酶	检查操作流程，注意不要漏加
	HRP 酶污染了叠氮钠	使用新配制的试剂，禁含叠氮钠
	试剂配制/使用有误	重做试验，严格按说明书操作，每次配制和使用前看清标签
显色弱	超过有效期的产品可能会产生很弱的信号	检查产品有效期
	缩短孵育时间能使实验信号变弱	检查孵育时间
	使用了被污染的试剂	检查试剂是否被污染
	仪器设定不正确，滤光片不匹配	仪器是否设定正确，滤光片的使用等
	洗涤操作不规范	洗涤不充分，使用手工洗板常出现
		洗瓶洗涤，每孔应完全充满洗涤缓冲液，倾出时应迅速
		若用洗板机，应校准并设定足够充满每孔的体积量。板内侧不应接触设备
		检查每孔是否有残留的洗液或每孔加样量的体积是否准确
		可在两次洗板之间加 30 秒的浸泡
	实验中孵育温度和时间不当	确定每一试验步骤的孵育温度和时间是否适当
高背景	酶加量过多	加酶前验看移液器调节量是否准确
		检查稀释度，若必要进行效价测定

储存条件：

未启封的试剂盒		4℃保存，请于保质期内使用。
已启封或重新溶解的试剂	1b 标准品和标本稀释液	可以整盒放入 4℃储存 1 个月。 2a 浓缩生物素化抗体和 3a 浓缩酶结合物需用现配。
	2a 浓缩生物素化抗体（100×）	
	2b 生物素化抗体稀释液	
	3a 浓缩酶结合物（避光 100×）	
	3b 酶结合物稀释液	
	4 浓缩洗涤液 20×	4℃或常温保存
	显色剂（避光）	
终止液	终止液	
	标准品	重溶后分装，-20℃存放一个月，避免反复冻融。稀释后的标准品使用后应丢弃，不得重复使用。
	抗体包被板条	实验中不用的板条应立即放回包装袋中，密封干燥 4℃保存。

以上储存条件均要求在试剂盒保质期内。

其它实验材料(不提供，但可协助购买)：

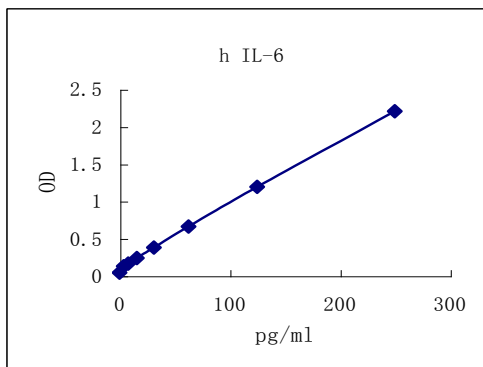
1. 酶标仪(450nm)
2. 高精度可调移液器及吸头：0.5-10,2-20,20-200,200-1000μl。
一次检测样品较多时，最好用多通道移液器
3. 自动洗板机或洗瓶
4. 37℃温箱
5. 双蒸水或去离子水
6. 坐标纸
7. 量筒

注意事项：

1. 试剂盒保存在2-8℃，除复溶后的标准品，其它成分不可冷冻。
2. 浓缩生物素化抗体(2a)、浓缩酶结合物(3a)装量极少，运输中颠簸和可能的倒置会使液体沾到管壁或瓶盖。使用前请离心处理以使附着于管壁或瓶盖的液体沉积到管底。
3. **不同批号试剂不可混用。**
4. 为避免交叉污染请使用一次性吸头。
5. 终止液和显色剂具腐蚀性，避免皮肤及粘膜直接接触，一旦接触到这些液体，请尽快用大量水冲洗。

特异性：

此试剂盒可检测天然和重组的人Total HSP27。



本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线为准

结果重复性:

板间，板内变异系数均<10%。

灵敏度:

最低检测人 Total HSP27 剂量小于 15pg/ml。 最低检出量测定方法:

20 个零标准的平均 OD 值增加两个标准差，再计算相应的浓度。

6. 使用干净的塑料容器配制洗涤液，使用前充分混匀试剂盒里的各种成份及样品。
7. 洗涤酶标板时应充分拍干，不要将吸水纸直接放入酶标反应孔中吸水。
8. 不要用其它来源的试剂混合或替代该产品的组分，不同批号的试剂盒组份不能混用，请在有效日期内使用本产品。
9. 在试验中标准品和样本检测时建议作双复孔或三复孔，加入试剂的顺序应一致，以保证所有反应孔孵育的时间一样。
10. 充分混匀对反应结果尤为重要，最好使用微量振荡器(使用最低频率进行振荡)。
11. 避免操作过程中酶标板干燥，干燥会使酶标板上生物成分迅速失活，影响实验结果。
12. 适当的稀释样品，使样品值落在标准曲线范围内，根据待测因子含量高、中、低的不同，建议采用1:100、1:10、1:2稀释样品。如果样品OD值高于最高标准，适当增加稀释度并重复检测。
13. 标准品稀释液，操作人，移液方式，洗涤方法，孵育时间及温度，试剂盒批次的不同均可能会导致结果的差异。
14. 此法可有效的消除可溶性受体、结合蛋白以及生物样品中的其他因素的干扰。

样品收集、处理及保存方法:

- 1. **细胞裂解液:** 收集细胞，用PBS清洗两次，确保第二次清洗后完全去除PBS残液。将细胞裂解液加入细胞中（ 1×10^7 细胞/ml），冰上放置15min，立刻检测或 $\leq -70^{\circ}\text{C}$ 保存。使用前， $2000\times\text{g}$ 离心5min，将上清转移至干净的试管中。检测总蛋白含量。如果需要，用样本稀释液稀释样本。
- 2. **保存:** 若样品不立即检测，请将其按一次用量分装， -20°C — -70°C 保存，避免反复冻融。尽量避免使用溶血或高血脂样本。如果血清中含有大量颗粒，检测前先离心或过滤去除；室温下解冻，请勿于 37°C 或更高的温度加热解冻。
- 3. **稀释:** 可根据实际情况，将标本做适当倍数稀释(建议做预实验，以确定稀释倍数)。

注: 裂解液（1mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 10 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin, 10 $\mu\text{g/ml}$ Pepstatin, 100 μM PMSE, 3 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin in PBS, PH7.2--7.4 ）

试剂准备:

- 1. 提前30min从冰箱中取出试剂盒，平衡至室温。
- 2. **洗涤缓冲液:** 从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶，这属于正常现象，加热并轻轻摇晃使结晶完全溶解后再配制。将浓缩洗涤液用双蒸水稀释(1:20)。未用完的放回 4°C 。

- 3. 若标本 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算标本含量。
- 4. 参考数据:

标准品浓度 (pg/ml)	OD值1	OD值2	平均值	矫正值
0	0.039	0.041	0.040	——
31.25	0.126	0.129	0.127	0.087
62.5	0.158	0.162	0.160	0.120
125	0.231	0.235	0.233	0.193
250	0.373	0.376	0.374	0.334
500	0.644	0.670	0.657	0.617
1000	1.190	1.187	1.188	1.148
2000	2.196	2.210	2.203	2.163

数据仅供参考，不同用户最佳显色时间会有所不同

操作要点提示:

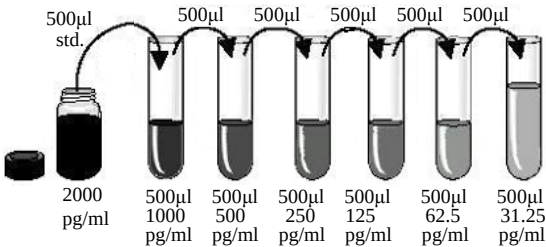
- 1. 配制各种试剂时要充分混匀，但要避免产生大量泡沫，以免加样时加入大量的气泡，产生加样误差。
- 2. 为避免交叉污染，在加入不同浓度的标准品、不同样品、不同试剂时谨记及时更换吸头。
- 3. 为了确保准确的结果，在每次孵育前均需使用新封板胶纸封住反应孔。
- 4. 显色剂在添加之前，应保持无色，请勿使用已变为蓝色的显色溶液。最佳显色时间对标准曲线很重要，肉眼可见前 3-4 孔有梯度蓝色，后 3-4 孔差别不明显，零孔无蓝色出现即可终止。
- 5. 每次检测均要做标准曲线，根据样品待测因子的含量，适当稀释或浓缩样本，最好做预实验。

结果判断:

- 1. 每个标准品和标本的OD值应减去空白孔的OD值，如果做复孔，求其平均值。
- 2. 使用计算机软件以吸光度OD值为纵坐标(Y)，相应的Total HSP27标准品浓度为横坐标(X)，生成相应的标准曲线，样品的Total HSP27含量可根据其OD值由标准曲线换算出相应的浓度。

- 3. **标准品：**加入标准品/标本稀释液(1b)1.0ml至冻干标准品(1a)中，待彻底溶解后，静置15分钟混匀(浓度为2000pg/ml)，然后根据需要进行稀释，见下图(建议标准曲线使用以下浓度： 2000、 1000、 500、 250、 125、 62.5、 31.25、 0 pg/ml)。稀释的标准品不得重复使用，未用完的标准品应按照一次用量分装后，将其放在-20~-70℃贮存，一次性使用，避免反复冻融。

标准品稀释方法：



- 4. **生物素化抗体工作液：**根据每孔需要100µl来计算总的用量，多配制100-200µl。以生物素化抗体稀释液(2b)稀释浓缩生物素化抗体(2a)(1:100)。最好现用现配。（稀释方法参照“第21页”）
- 5. **酶结合物工作液：**以酶结合物稀释液(3b) 稀释浓缩酶结合物(3a)(1:100)。最好现用现配。（稀释方法参照“第21页”）

操作步骤:

1. 按照上述准备工作配制好各种溶液。
2. 根据待测样品数量和标准品的数量决定所需的板条数，并增加1孔作为空白对照孔。分别将标本和不同浓度标准品(100μl /孔)加入相应孔中（零孔只加标准品/样本稀释液），用封板胶纸封住反应孔，37℃孵箱孵育90分钟（空白对照孔除外）。
3. 洗板4次：(1)自动洗板机：要求注入的洗涤液为350μl，注入与吸出间隔15-30秒。(2)手工洗板：甩尽孔内液体，每孔加洗涤液350μl，静置30秒后甩尽液体，在厚迭吸水纸上拍干。
4. 加入生物素化抗体工作液(100μl /孔)。用封板胶纸封住反应孔，37℃孵箱孵育60分钟（空白对照孔除外）。
5. 洗板4次。
6. 加入酶结合物工作液(100μl /孔)。用封板胶纸封住反应孔，37℃孵箱孵育30分钟（空白对照孔除外）。
7. 洗板4次。
8. 加入显色剂100μl /孔，避光，37℃孵箱孵育10-20分钟。
9. 加入终止液100μl /孔，混匀后即刻测量OD450值(5分钟内)。

操作流程:

