版本号： Datasheet-KE00959-A.0

生效日期： 2025-07-24

人AK2双抗夹心ELISA检测试剂盒

请在实验前仔细阅读本说明书

产品货号：	KE00959
规 格：	96T
灵敏度：	0.03 ng/mL
检测范围:	0.313-20 ng/mL
用 途：	此试剂盒用于定量检测细胞裂解液中的人AK2浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

目录

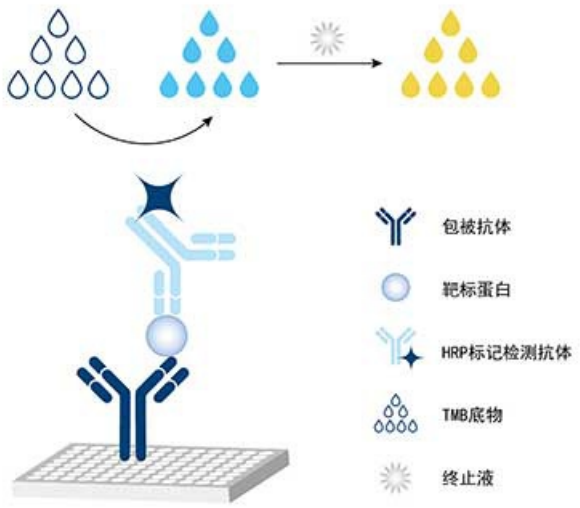
一：背景信息 3
二：检测原理 3
三：需自备的实验器材 3
四：试剂盒组分及储存 4
五：实验注意事项 4
六：样本准备 4
七：试剂准备 5
八：实验步骤 6
九：实验参数 7
9.1 参考标曲图 7
9.2 精密度 7
9.3 加标回收率 7
9.4 样本值 8
9.5 灵敏度 8
9.6 线性 8
9.7 特异性 8
十：参考文献 8

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

一：背景信息

AK2（腺苷酸激酶 2，线粒体型）也被称为 ADK2，属于腺苷酸激酶家族。它在能量代谢和能量转移过程中发挥着独特的作用，通过调节细胞质基质与线粒体之间的 ATP/ADP 比率来实现这一功能，并且在脂肪细胞和 B 细胞的分化过程中其表达会增加。AK2 可催化将磷酸基团从 ATP 转移到 AMP 上的可逆转移过程。AK2 的缺陷会导致网状发育不良（RDYS）。它通过选择性剪接产生了 6 种同工型。

二：检测原理



◀双抗夹心模式图 (检测抗体直标HRP)

按操作顺序形成抗体夹心结构后，加入TMB底物，板孔液体由无色变成蓝色，再加入终止液液体变为黄色后进行吸光度值测定。

三：需自备的实验器材

3.1 酶标仪 (可读取450 nm和630 nm双波长)；

3.2 高精度移液器及一次性移液器枪头；

3.3 洗板机 (亦可手动洗板)；

3.4 EP管 (用于稀释标准品及样本)；

3.5 吸水毛巾或滤纸 (用于拍干)；

3.6 烧杯和量筒；

3.7 用于ELISA实验的数据分析的统计拟合软件 (推荐四参数拟合方法)，如：Origin，ELISA Calc等。

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

四：试剂盒组分及储存

英文名称	中文名称	规格	数量
Microplate	预包被酶标板 - 96 孔板	8孔 × 12条	1 块
Protein standard	标准品 - 冻干粉状 *	40 ng/瓶	2 瓶
Detection antibody, HRP-conjugated (100×)	HRP标记检测抗体浓缩液（100×） **	120 uL/管	1 管
Sample Diluent PT 3	样本稀释液 PT 3	30 mL/瓶	1 瓶
Detection Diluent	抗体稀释液	30 mL/瓶	1 瓶
Wash Buffer Concentrate (20×)	浓缩洗涤液（20×）	30 mL/瓶	1 瓶
Extraction Reagent	裂解液	30 mL/瓶	1 瓶
Tetramethylbenzidine Substrate (TMB)	显色底物 TMB	12 mL/瓶	1 瓶
Stop Solution	终止液	12 mL/瓶	1 瓶
Plate Cover Seals	封板膜		4张
储存条件： 1：未开启试剂盒可在2-8°C条件下存放6个月或者在-20°C条件下存放1年 2：已开启试剂盒可在2-8°C存放7天 3：每次实验均使用新的标准品,使用后丢弃			

* 使用对应的样本稀释液对标准品进行复溶，复溶过程避免产生气泡
** 开盖前请离心

五：实验注意事项

5.1 避免皮肤接触终止液以及TMB 显色液；

5.2 在实验过程中，注意穿戴个人防护装备，如实验服，手套，口罩和护目镜；

5.3 请勿将不同批次的试剂进行混用，过期产品请勿使用；

5.4 在使用自动洗板机时，板孔加入洗涤液之后，设置30秒的浸泡程序，以提高分析的精确度。

六：样本准备

6.1 细胞裂解液：收集细胞后，用预冷(2-8°C)的1×PBS洗3次，500×g离心5 min。细胞计数，离心弃上清；加PMSF至细胞裂解液中，终浓度为1 mM；按每1×10 ^{7}个细胞，加入1 mL细胞裂解液(含PMSF)，冰上裂解30 min，其间上下颠倒使裂解更充分，超声波破碎处理，8000×g-10000×g离心5 min，分离上清，分装后-80°C存放，并用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定总蛋白浓度，避免反复冻融。

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

七：试剂准备

7.1 洗涤液（1×）：

如果洗涤液（20×）有晶体析出，37°C加热至晶体全部溶解。按1:20稀释倍数进行稀释：如取30 mL 浓缩洗涤液（20×），加入570 mL 超纯水或去离子水，得到洗涤液（1×）。

7.2 HRP标记检测抗体（1×）：

开盖前瞬时离心，按1:100比例进行稀释，稀释前根据预先计算实验所需的总量配制（100 uL/孔）, 实际配制时应多配制0.1-0.2 mL。如10 uL HRP标记检测抗体浓缩液（100×）加 990uL **抗体稀释液**进行配制，轻轻混匀。

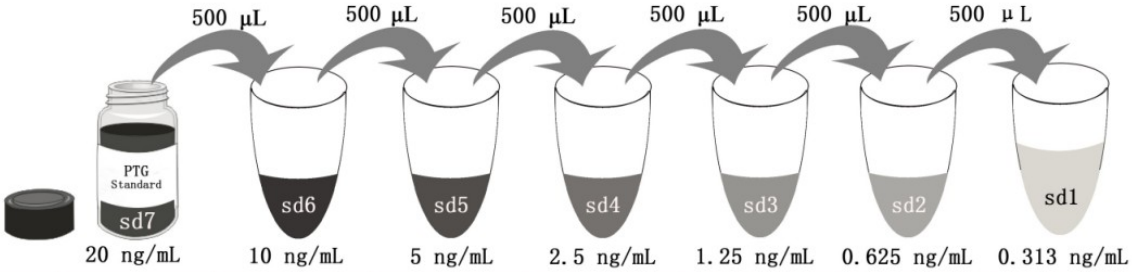
7.3 待检测样本：

不同的样本使用相应的样本稀释液进行稀释，如果样本检测值超过标曲最高范围，可将样本进行一定的稀释后再进行实验，使样本的检测值处于标曲范围内，不同样本的稀释倍数需自行优化。

稀释比推荐如下：细胞裂解液样本1:2或1:4稀释；样品采集、处理和储存的差异可能导致测值的改变。

7.4 梯度稀释的标准品：

使用2 mL PT 3 样本稀释液复溶标准品，具体操作如下:



Add # µL of Standard diluted in the previous step	—	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
# µL of Sample Diluent PT 3	**2000 µL**	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
	"sd7"	"sd6"	"sd5"	"sd4"	"sd3"	"sd2"	"sd1"

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

八：实验步骤

实验前，需要将所需试剂在室温平衡20-30min（HRP标记检测抗体浓缩液不需要平衡室温，即用即取）；在进行标准品、样本以及不同试剂加样时，更换枪头，避免接触微孔板的内表面，不同的试剂，使用不同的加样槽。

8.1 根据实验用量，取出需要用到的酶标板条，剩余板条加入干燥剂放入铝箔袋密封后存放于4°C，并于一周之内用完；

8.2 加样，分别设零孔、标准孔、待测样本孔。零孔加样本稀释液100 μL，余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本100 μL/孔，注意不要产生气泡（建议标准品和样本都做复孔，尽量避免实验误差，确保上样不间断，5-10 min完成加样）；

8.3 酶标板盖上覆膜，37°C孵育2 h；

8.4 洗涤

1） 揭开封板膜（动作轻柔，避免动作过大导致液体溢出串孔），弃液体，拍干；

2） 洗涤液（1×）洗涤板条，每孔350-400 μL，洗涤后，甩掉液体拍干板条，重复此步骤4次，避免异物进入板孔以及板条干燥；

8.5 每孔加100 μL HRP标记检测抗体（1×）(参照试剂准备部分7.2)，盖上封板膜，37°C孵育40 min；

8.6 重复步骤8.4；

8.7 显色：每孔加TMB显色液100 μL，37°C避光显色 15-20 min（如果颜色偏浅，可适当延长显色时间，不超过30 min；保持显色底物始终处于避光状态，显色底物在加样前应是无色透明，如有变色，请勿使用）；

8.8 终止：每孔加终止液100 μL，蓝色变黄色。终止液与TMB显色液的加样顺序一致；（注意：眼睛和皮肤避免接触终止液）

8.9 读数：以630 nm为校正波长，用酶标仪在450 nm波长测量各孔的光密度（OD值）。加入终止液后5 min内进行读数，若无630 nm波长，也可直接使用450 nm波长读数；

8.10 数据分析: 每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD值为纵坐标，使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

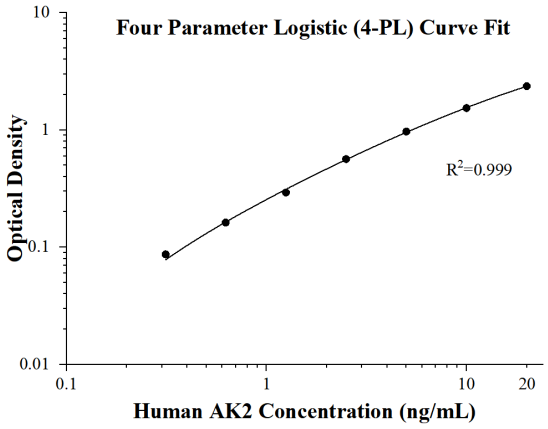
操作流程如下：

步骤	试剂	体积	孵育时间	洗涤次数	孵育温度
1	标准品或样本	100 μL	120 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
2	HRP标记检测抗体（1×）	100 μL	40 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
3	显色 TMB	100 μL	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37°C孵育，避光
4	终止液	100 μL	0 分钟	不需要洗涤	-
5	加入终止液后以630 nm为校正波长，在450 nm处测量OD值，此过程建议不超过5分钟				

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

九：实验参数

9.1 参考标曲图



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.029 0.03	0.0295	-
0.313	0.1178 0.115	0.1164	0.0869
0.625	0.1949 0.1885	0.1917	0.1622
1.25	0.3239 0.3212	0.32255	0.29305
2.5	0.5944 0.594	0.5942	0.5647
5	1.0059 0.9945	1.0002	0.9707
10	1.5697 1.5664	1.56805	1.53855
20	2.4329 2.3519	2.3924	2.3629

9.2 精密度

板内精密度: 3个不同浓度的样本在板内重复测定 8 次;

板间精密度: 3个不同浓度的样本在板间重复测定 16 次。

板内精密度 (CV内)				
样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%
1	8	10.20	0.37	3.61
2	8	2.52	0.10	3.78
3	8	0.67	0.02	3.54

板间精密度 (CV 间)				
样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%
1	16	10.05	0.36	3.54
2	16	2.47	0.11	4.34
3	16	0.66	0.03	3.93

9.3 加标回收率

样本稀释后，在标曲范围内选择高、中、低3个浓度，进行人AK2的加标回收率实验，结果如下：

样本类型	稀释倍数	平均值 (%)	范围 (%)
细胞裂解液	1:4	82	79-87
	1:8	84	81-86

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

9.4 样本值

细胞裂解液

	人AK2 (ng/mL)	总蛋白量 (mg/mL)
HeLa细胞裂解液	6.09	1.20
HepG2细胞裂解液	6.05	1.10
HL-60细胞裂解液	7.93	1.40

9.5 灵敏度

用20个重复的零孔平均OD值加上两倍标准差得到的OD值带入标准曲线拟合出对应的浓度值，此试剂盒中人AK2的灵敏度为0.03 ng/mL。

9.6 线性

用对应样本稀释液稀释样本，使稀释后的检测值处于标曲范围内，线性数据如下：

		细胞裂解液
1:2	均值（%）	100
	范围（%）	-
1:4	均值（%）	84
	范围（%）	83-85
1:8	均值（%）	86
	范围（%）	84-88
1:16	均值（%）	102
	范围（%）	93-112

9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人AK2。

十：参考文献

1. Lagresle-Peyrou, Chantal et al. Nature genetics vol. 41,1 (2009): 106-11.
2. Pannicke, Ulrich et al. Nature genetics vol. 41,1 (2009): 101-5.
3. Dzeja, Petras, and Andre Terzic. International journal of molecular sciences vol. 10,4 1729-1772.

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com