

Speedy™ 人APEX1一步法ELISA检测试剂盒

请在实验前仔细阅读本说明书

产品货号: SE50283
规格: 96T
灵敏度: 0.02 ng/mL
检测范围: 0.625-40 ng/mL
用途: 此试剂盒用于定量检测细胞裂解液中人APEX1浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

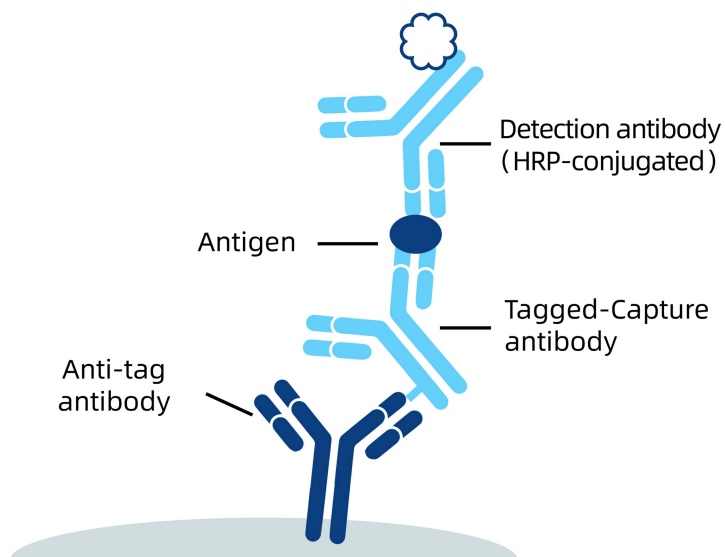
目录

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	8
9.3 加标回收率	8
9.4 样本值	8
9.5 灵敏度	8
9.6 线性	9
9.7 特异性	9
十：参考文献	9

一：背景信息

APEX1 (Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1)，又称APE1、HAP1或Ref-1，是一种多功能DNA修复酶。该蛋白以双功能特性著称：一方面APEX1是碱基切除修复 (BER) 通路的核心组分，通过切割无嘌呤/无嘧啶 (AP) 位点启动DNA损伤修复，维持基因组稳定性。另一方面，APEX1还具有氧化还原活性，能够还原激活多种转录因子 (如AP-1、NF- κ B、p53、HIF-1 α 等)，调控基因表达。此外，该蛋白参与核糖核苷酸还原酶调控、RNA加工和线粒体DNA修复。APEX1在多种肿瘤中高表达，与肿瘤耐药性、放射抵抗和预后不良密切相关，是潜在的肿瘤治疗靶点和预后标志物。其功能缺失与神经退行性疾病、癌症易感性和衰老相关。

二：检测原理



抗标签抗体预先包被于板孔，可结合带标签的捕获抗体。抗原或样本、捕获抗体及辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的检测抗体加入后，在溶液中形成夹心复合物。在HRP催化下，四甲基联苯胺 (TMB) 使底物溶液由无色变蓝，加入终止液后变黄。溶液颜色深浅与结合蛋白量成正比。测量波长为450 nm，校正波长为630 nm。

三：需自备的实验器材

- 3.1 酶标仪 (可读取450nm和630nm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，也可使用Proteintech 公司数据分析网站：<https://www.ptgcn.com/products/elisa-kits/>；
- 3.8 微孔板恒温振荡器。

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 *	80 ng/瓶	2 瓶
Capture Antibody (100×)	捕获抗体浓缩液 (100×) **	60 uL/管	1 管
Detection antibody, HRP-Conjugated (100×)	HRP标记检测抗体浓缩液 (100×) **	60 uL/管	1 管
Sample Diluent PT 4B1	样本稀释液 PT 4B1	30 mL/瓶	1 瓶
Detection Diluent PT PB1	抗体稀释液 PT PB1	15 mL/瓶	1 瓶
Wash Buffer Concentrate (20×)	浓缩洗涤液 (20×)	30 mL/瓶	1 瓶
Extraction Reagent	裂解液	15 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, 详见7.4部分, 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。

七：试剂准备

7.1 洗涤液 (1×) 的配制:

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1×洗涤液。

7.2 抗体混合液 (1×) 的配制:

开盖前瞬时离心, 将捕获抗体和检测抗体稀释分别按1:100比例稀释到同一管稀释液中, 配制成检测所需的工作液。例如: 将50 μL包被抗体浓缩液 (100×) 和50 μL检测抗体浓缩液 (100×) 加入 4900 μL抗体稀释液, 混匀配制成1×抗体混合液。

7.3 待检测样本:

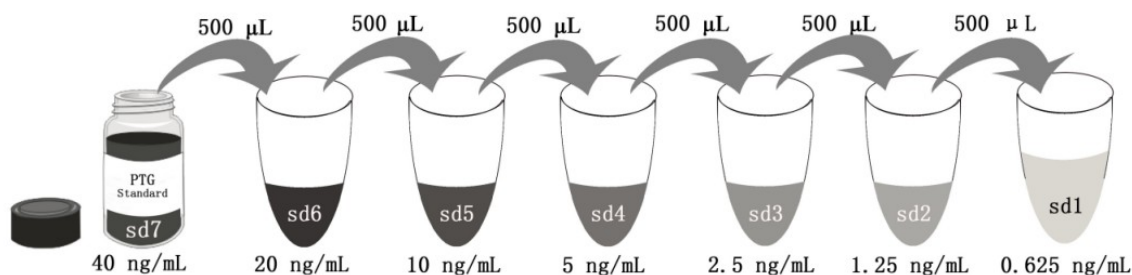
不同的样本使用相应的样本稀释液进行稀释, 样本最低稀释比为1:2, 即每个样本孔中最多加入样本原液25 μL。

如果样本检测值超过标曲最高范围, 可将样本进一步稀释后再进行实验, 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1:16到1:64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 4B1 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 4B1	2000 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL
	"sd7"	"sd6"	"sd5"	"sd4"	"sd3"	"sd2"	"sd1"

八：实验步骤

实验前,需要将所需试剂在室温平衡20-30 min (捕获抗体浓缩液和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50 μ L,余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本50 μ L/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 每孔加50 μ L 抗体混合液(1 \times)(参照试剂准备部分7.2),盖上封板膜,恒温振荡器上37°C 400 rpm 孵育 1 h(若无恒温振荡器,此步骤建议37°C静置孵育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 \times)洗涤板条,每孔350-400 μ L,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;

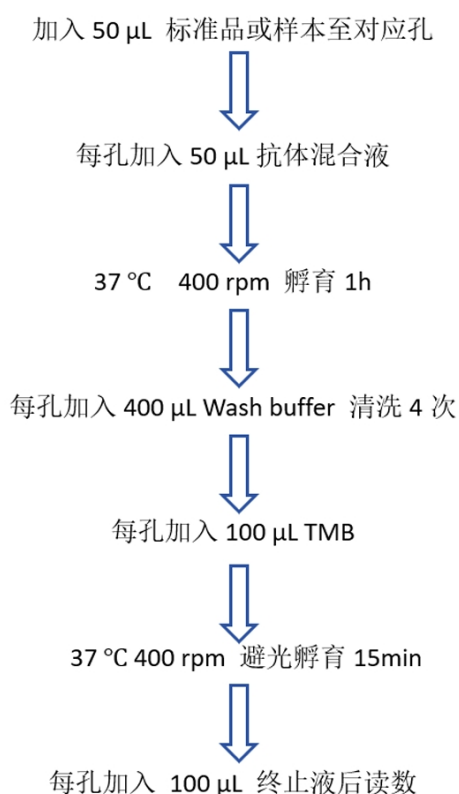
8.5 显色:每孔加TMB显色液100 μ L,恒温振荡器上37°C 400 rpm 孵育15-20 min(如果颜色偏浅,可适当延长显色时间,不超过30 min;保持显色底物始终处于避光状态,显色底物在加样前应是无色透明,如有变色,请勿使用);

8.6 终止:每孔加终止液100 μ L,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)

8.7 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;

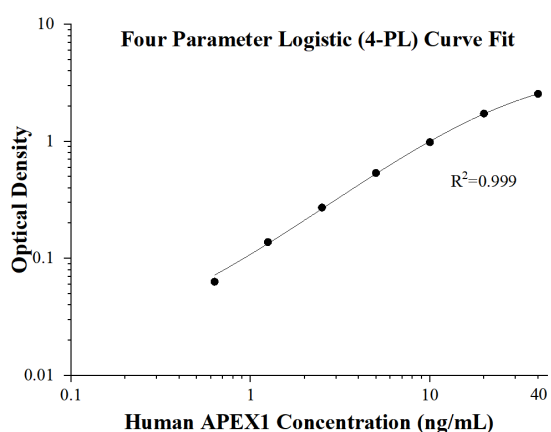
8.8 数据分析:每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值,设置复孔,取其平均值。以标准品的浓度为横坐标,OD值为纵坐标,使用专业软件(如Origin、ELISACalc等)进行四参数拟合(4-PL),根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度,乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

操作流程如下：



九：实验参数

9.1 参考标曲图



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.03 0.0312	0.0306	-
0.625	0.0935 0.0942	0.0939	0.0633
1.25	0.1666 0.1709	0.1688	0.1382
2.5	0.3028 0.303	0.3029	0.2723
5	0.5677 0.5684	0.5681	0.5375
10	1.0048 1.0266	1.0157	0.9851
20	1.7594 1.7673	1.7634	1.7328
40	2.5022 2.6604	2.5813	2.5507

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)					板间精密度 (CV间)				
样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%	样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%
1	8	21.66	0.72	3.32	1	16	22.24	1.24	5.58
2	8	5.08	0.14	2.76	2	16	5.16	0.22	4.26
3	8	2.53	0.11	4.35	3	16	2.55	0.11	4.31

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APEX1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	1:64	84	82-87
	1:128	94	89-103

9.4 样本值

细胞裂解液

	人APEX1 (ng/mL)	总蛋白量 (mg/mL)
HepG2细胞裂解液	1500.78	1.50
HuH-7细胞裂解液	519.28	1.20
Jurkat细胞裂解液	738.83	1.20
HEK-293细胞裂解液	448.41	1.50
A549 细胞裂解液	604.69	1.20
U-87 MG细胞裂解液	137.44	1.20

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APEX1的灵敏度为0.02 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：

(细胞裂解液样本预先稀释32倍。)

		细胞裂解液
1:2	均值 (%)	100
	范围 (%)	-
1:4	均值 (%)	107
	范围 (%)	106-109
1:8	均值 (%)	101
	范围 (%)	98-104
1:16	均值 (%)	87
	范围 (%)	85-89

9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人APEX1。

十：参考文献

1. Chen, Qian et al. Free radical biology & medicine vol. 225 (2024): 359-373.
2. Sun, Zhipeng et al. Aging vol. 14,19 (2022): 7959-7971.
3. Zhong, Renhao et al. Experimental eye research vol. 255 (2025): 110393.
4. Cao, Lei et al. Aging vol. 12,5 (2020): 4573-4591.