

小鼠P62/SQSTM1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: KE10163
规格: 96T
灵敏度: 0.20 ng/mL
检测范围: 0.78-50 ng/mL
用途: 此试剂盒用于定量检测细胞裂解液和组织裂解液中的小鼠P62/SQSTM1浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

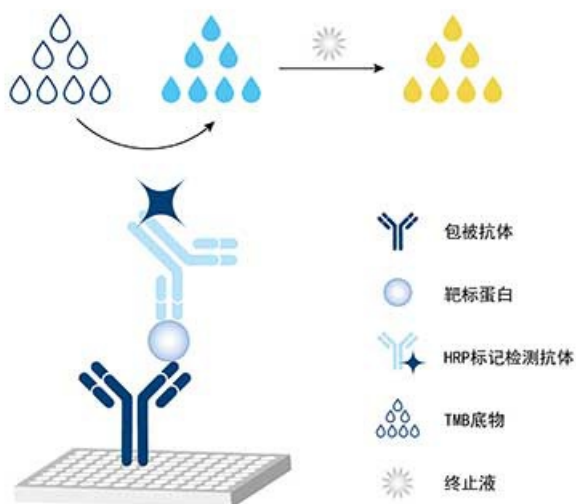
目录

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	5
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	8
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	9

一：背景信息

P62/SQSTM1是一种与选择性自噬、细胞信号通路和肿瘤发生有关的多功能接头蛋白。P62参与穿梭泛素化和聚集蛋白的自噬降解。P62在自噬过程中被降解，这使得其细胞内水平成为自噬进程的标志。P62位于Ras/ Raf/ MAPK和NFκB等多种信号通路的交叉点，在癌症中发挥重要作用。P62是人类疾病（包括亨廷顿氏病、阿尔茨海默病、帕金森病和肾病性胱氨酸病）中发现的包涵体/蛋白聚集体的一个组成部分。

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。

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 *	100 ng/瓶	2 瓶
Detection antibody, HRP-conjugated (100×)	HRP标记检测抗体浓缩液 (100×) **	120 µL/支	1 支
Sample Diluent PT 4B1	样本稀释液 PT 4B1	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℃条件下存放6个月或者在-20℃条件下存放1年 2：已开启试剂盒可在2-8℃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。

6.2 组织裂解液:

- 1) 使用预冷的1×PBS清洗组织,吸干水分后,用剪刀剪碎,加入适量的裂解液(加PMSF至裂解液中,终浓度为1 mM,每100 mg组织加入1 mL裂解液,不同样本需自行优化);
- 2) 转移到预冷玻璃匀浆器中,匀浆约20-30下。匀浆效果与细胞类型和组织类型相关,不同细胞或组织所需的匀浆次数有所不同,需自行优化;
- 3) 匀浆20-30次后取约2-3 μ L细胞或组织匀浆液滴在盖玻片上并在显微镜下观察,如见细胞核周晕环或完整的细胞形态,说明细胞仍完整。如果有70-80%的细胞均无核周晕环和完整细胞形态,说明细胞已经充分破碎,则进行下一步实验。否则,重新匀浆10-30次直到细胞至少90%已经破碎;
- 4) 细胞破碎后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×) :

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 μ L/孔),实际配制时应多配制0.1-0.2 mL。如10 μ L HRP标记检测抗体浓缩液 (100×) 加 990 μ L 抗体稀释液进行配制,轻轻混匀。

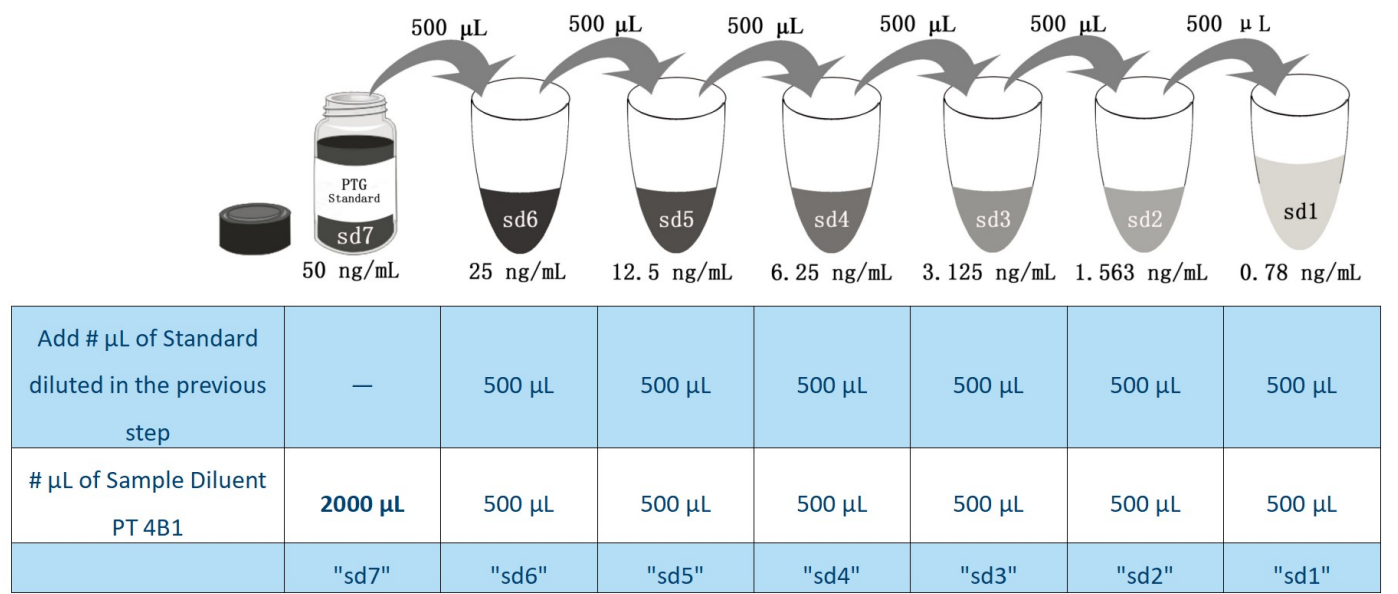
7.3 待检测样本:

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1:20或1:40稀释;组织裂解液样本1:8或1:16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：



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℃，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℃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℃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℃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；

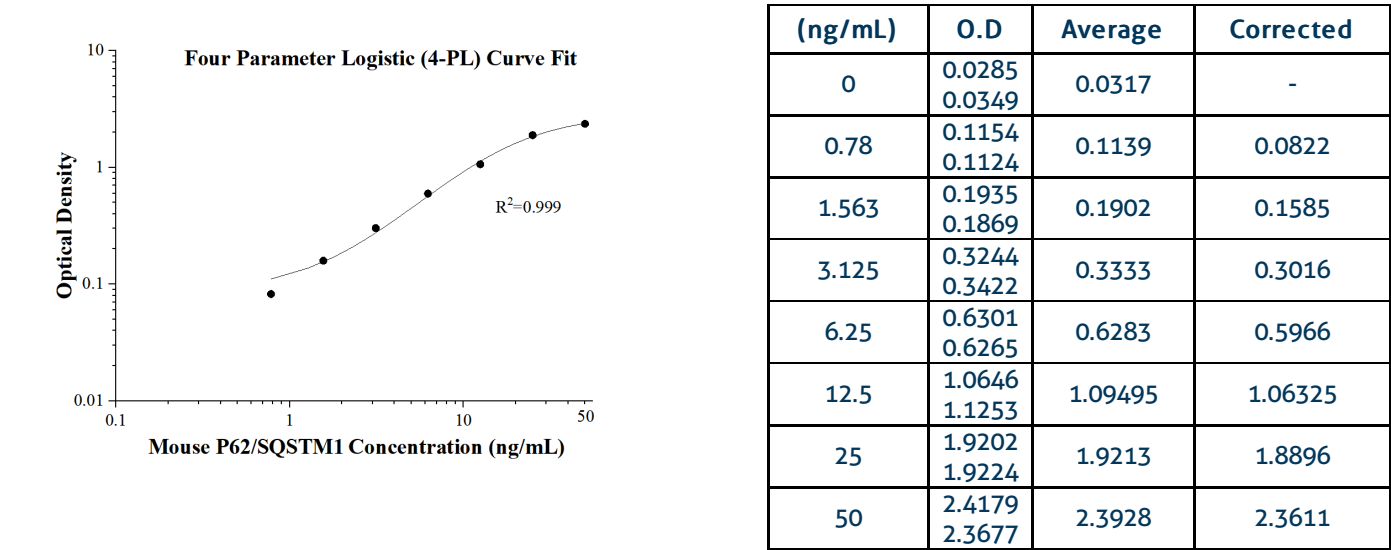
8.10 数据分析：每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD值为纵坐标，使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

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℃孵育
2	HRP标记检测抗体（1×）	100 μL	40 分钟	4 次	覆膜后37℃孵育
3	显色 TMB	100 μL	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37℃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				

九：实验参数

9.1 参考标曲图



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	22.41	2.08	9.30	1	16	22.31	1.82	8.15
2	8	5.17	0.33	6.47	2	16	5.49	0.47	8.56
3	8	2.80	0.28	9.86	3	16	2.77	0.23	8.39

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，进行小鼠P62/SQSTM1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	1:80	109	103-119
	1:160	114	113-114
组织裂解液	1:64	88	85-93

9.4 样本值

细胞/组织裂解液

	小鼠P62/SQSTM1 (ng/mL)	总蛋白量 (mg/mL)
NIH/3T3细胞裂解液	665.08	4.30
RAW 264.7细胞裂解液	513.14	1.30
Mouse brain组织裂解液	223.61	6.60

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，此试剂盒中小鼠P62/SQSTM1的灵敏度为0.20 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10倍，组织裂解液样本预先稀释4倍。)

		细胞裂解液	组织裂解液
1:2	均值 (%)	100	100
	范围 (%)	-	-
1:4	均值 (%)	89	103
	范围 (%)	78-100	93-112
1:8	均值 (%)	85	102
	范围 (%)	78-93	100-105
1:16	均值 (%)	90	107
	范围 (%)	78-102	102-113

9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组小鼠P62/SQSTM1。

十：参考文献

1. Nezis, Ioannis P, and Harald Stenmark. Antioxidants & redox signaling vol. 17,5 (2012): 786-93.
2. Puissant, Alexandre et al. American journal of cancer research vol. 2,4 (2012): 397-413.
3. Sansanwal, Poonam, and Minnie M Sarwal. Pediatric nephrology (Berlin, Germany) vol. 27,11 (2012): 2137-2144.