

人JNK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: KE00072
规格: 96T
灵敏度: 0.1 ng/mL
检测范围: 1.56 - 100 ng/mL
用途: 此试剂盒用于定量检测细胞裂解液中人JNK浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

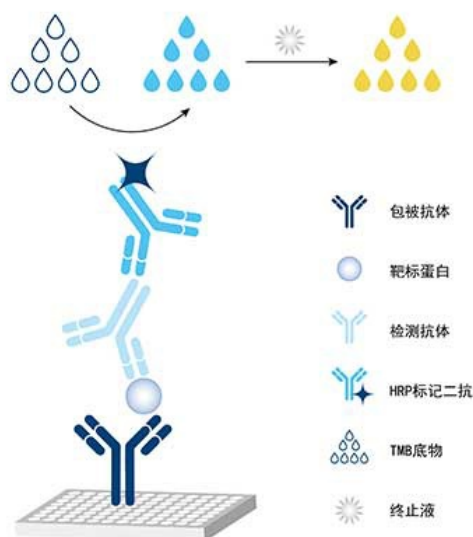
目录

| | |
|------------|---|
| 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 | 7 |
| 9.3 加标回收率 | 7 |
| 9.4 灵敏度 | 7 |
| 9.5 线性 | 8 |
| 9.6 特异性 | 8 |
| 十：参考文献 | 8 |

一：背景信息

应激激活蛋白激酶（JNK）也被称为丝裂原活化蛋白激酶8（MAPK8）、PRKM8、SAPK1、SAPK1C，属于MAP激酶亚家族。在对紫外线的反应过程中，JNK通过Thr-Pro-Tyr基序的双重磷酸化激活。此外，JNK活性在肥胖者中异常升高。研究发现，在2种不同的肥胖模型小鼠中，JNK的缺失可降低肥胖，显著提高胰岛素敏感性，增强胰岛素受体信号转导能力。JNK是肥胖和胰岛素抵抗的重要调节因子，也是治疗的潜在靶点。该ELISA试剂盒适用于检测细胞裂解物。

二：检测原理



◀双抗夹心模式图 (检测抗体不标记)

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 * | 200 ng/瓶 | 2 瓶 |
| Detection antibody (100×) | 检测抗体浓缩液 (100×) ** | 120 μL/支 | 1 支 |
| HRP-conjugated antibody (100×) | HRP标记二抗浓缩液 (100×) ** | 120 μL/支 | 1 支 |
| Sample Diluent PT 5-ec | 样本稀释液 PT 5-ec | 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℃)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℃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 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 μL/孔), 实际配制时应多配制0.1-0.2 mL。如10 μL 检测抗体浓缩液 (100×) 加 990μL 抗体稀释液进行配制, 轻轻混匀。

7.3 HRP标记二抗 (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 μL/孔), 实际配制时应多配制0.1-0.2 mL。如10 μL HRP标记二抗浓缩液 (100×) 加 990μL 抗体稀释液进行配制, 轻轻混匀。

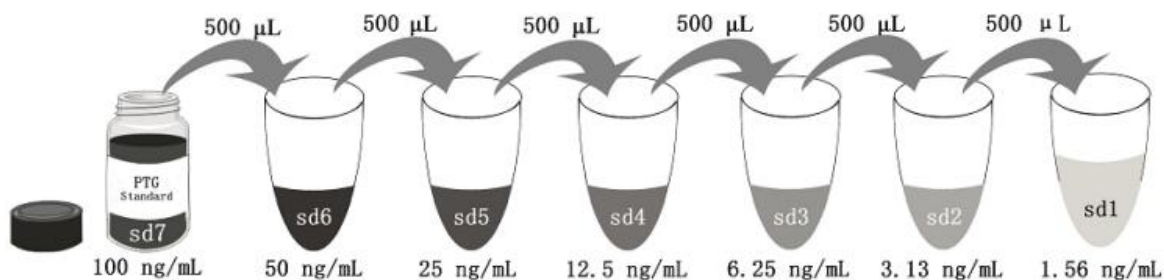
7.4 待检测样本：

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。

7.5 梯度稀释的标准品：

使用2 mL PT 5-ec 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 5-ec | 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（检测抗体浓缩液、HRP标记二抗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1h；

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 检测抗体（1×）（参照试剂准备部分7.2），盖上封板膜，37°C孵育1h；

8.6 重复步骤8.4；

8.7 每孔加 100 μL HRP标记二抗（1×）（参照试剂准备部分7.3），盖上封板膜，37°C孵育40 min；

8.8 重复步骤8.4；

8.9 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）；

8.10 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）

8.11 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；

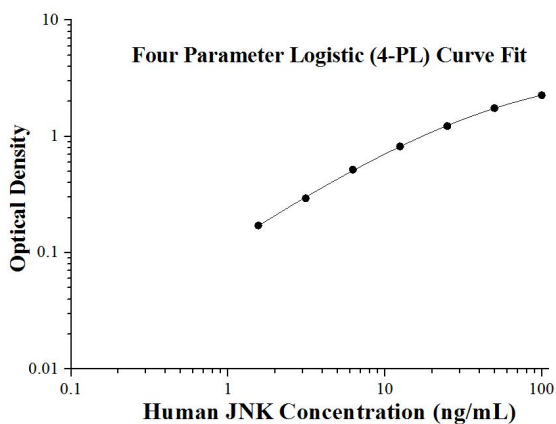
8.12 数据分析：每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

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 | 60 分钟 | 4 次 | 覆膜后37°C孵育 |
| 2 | 检测抗体 (1×) | 100 μL | 60 分钟 | 4 次 | 覆膜后37°C孵育 |
| 3 | HRP标记二抗 (1×) | 100 μL | 40 分钟 | 4 次 | 覆膜后37°C孵育 |
| 4 | 显色 TMB | 100 μL | 15-20 分钟 | 不需要洗涤 | 覆膜后37°C孵育，避光 |
| 5 | 终止液 | 100 μL | 0 分钟 | 不需要洗涤 | - |
| 6 | 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



| (ng/mL) | O.D | Average | Corrected |
|---------|----------------|---------|-----------|
| 0 | 0.022 0.019 | 0.0205 | - |
| 1.56 | 0.19 0.194 | 0.192 | 0.1715 |
| 3.13 | 0.33 0.299 | 0.3145 | 0.294 |
| 6.25 | 0.586 0.49 | 0.538 | 0.5175 |
| 12.5 | 0.887 0.793 | 0.84 | 0.8195 |
| 25 | 1.309 1.188 | 1.2485 | 1.228 |
| 50 | 1.74 1.81 | 1.775 | 1.7545 |
| 100 | 2.309 2.25 | 2.2795 | 2.259 |

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 20次；

板间精密度：3个不同浓度的样本在板间重复测定 24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 | 20 | 82.0 | 5.5 | 6.7 |
| 2 | 20 | 28.5 | 0.8 | 2.8 |
| 3 | 20 | 6.3 | 0.3 | 5.3 |

| 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 | 24 | 86.0 | 6.3 | 7.3 |
| 2 | 24 | 28.0 | 2.0 | 7.2 |
| 3 | 24 | 5.5 | 0.5 | 8.9 |

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JNK的加标回收率实验，结果如下；

| 样本类型 | 稀释倍数 | 均值 (%) | 范围 (%) |
|-------|------|--------|--------|
| 细胞裂解液 | 1:5 | 103 | 99-110 |
| | 1:10 | 96 | 85-107 |

9.4 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JNK的灵敏度为 0.1 ng/mL。

9.5 线性

细胞裂解液加入高浓度的人JNK蛋白，梯度稀释后检测样本加标线性，线性数据如下：

| 稀释倍数 | | 细胞裂解液 |
|------|--------|--------|
| 1:5 | 均值 (%) | 77 |
| | 范围 (%) | 71-83 |
| 1:10 | 均值 (%) | 91 |
| | 范围 (%) | 83-98 |
| 1:20 | 均值 (%) | 95 |
| | 范围 (%) | 89-101 |
| 1:40 | 均值 (%) | 99 |
| | 范围 (%) | 89-109 |

9.6 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人JNK

十：参考文献

- 1.Hirosumi J, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. Nature. 2002 Nov 21;420(6913):333-6.
- 2.Yang CC, et al. Sialic acid rescues repurified lipopolysaccharide-induced acute renal failure via inhibiting TLR4/PKC/gp91-mediated endoplasmic reticulum stress, apoptosis, autophagy, and pyroptosis signaling. Toxicol Sci. 2014 Sep;141(1):155-65.
- 2.Wu J, et al. Mkl1 knockout mice demonstrate the indispensable role of Mkl1 in necroptosis. Cell Res. 2013 Aug;23(8):994-1006.