

人 Phospho-P53 (Ser15)双抗夹心 Elisa 检测试剂盒

产品货号: KE40001

规格: 96T

灵敏度: 2.3 ug/mL

用途: 此试剂盒用于定量检测细胞裂解液, 组织裂解液和组织匀浆中 Phospho-P53 (Ser15)浓度 (请在实验前仔细阅读本说明书, 本产品仅用于科学研究, 不适用于临床诊断)

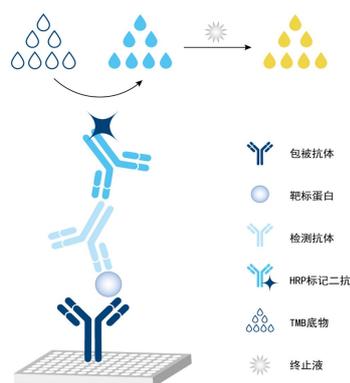
目 录

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

一：背景信息

稳定的 p53 转录激活编码参与细胞周期停滞、DNA 修复和/或细胞凋亡，并抑制促生长基因的转录激活过程。在正常条件下，p53 在大多数细胞中的表达水平很低或检测不到，半衰期为几分钟。在应激条件下，例如电离辐射或细胞毒剂引起的 DNA 损伤，内源性 p53 通过一系列生理反应，包括共济失调毛细血管扩张症突变 (ATM)/ATM 和 Rad3 相关(ATR)激活、p53 磷酸化和乙酰化、MDM2 与 p53 的结合减弱。丝氨酸 15 的磷酸化还可以防止 p53 从细胞核中输出，并通过增加与 p300 共激活因子的结合来刺激 p53 转录活性。

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：试剂盒组分及储存

英文名称	中文名称	规格	数量	储存条件
Microplate	预包被酶标板-96 孔板	8 孔 X 12 条	1 块	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。
Phospho-P53 (Ser15) Detection antibody (100X)	检测抗体浓缩液 (100X) **	120 uL/支	1 支	
HRP-conjugated antibody (100X) -	HRP 标记二抗浓缩液 (100X) **	120 uL/支	1 支	
Sample Diluent PT 4	样本稀释液 PT 4	30 mL/瓶	1 瓶	
Detection Diluent	抗体稀释液	30 mL/瓶	1 瓶	
Wash Buffer Concentrate (20X)	浓缩洗涤液 (20X)	30 mL/瓶	1 瓶	
Extraction Reagent	裂解液	30 mL/瓶	1 瓶	
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		3 张	

** 开盖前请离心

此试剂盒不提供阳性质控品，如有需要，可参照参考标曲图中的阳性对照样本制备

四：需自备的实验器材

- 4.1 酶标仪（可读取 450nm 和 630nm 双波长）
- 4.2 高精度移液器及一次性移液器枪头
- 4.3 超纯水或去离子水
- 4.4 洗板机（亦可手动洗板）
- 4.5 EP 管（用于稀释标准品及样本）
- 4.6 吸水毛巾或滤纸（用于拍干）
- 4.7 烧杯和量筒
- 4.8 100 mM PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride) 存储液 (1g PMSF 溶于 57mL 异丙醇), 样本需要裂解才用;
- 4.9 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;

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 1X PBS 洗 3 次，500 x g 离心 5min。细胞计数，离心弃上清；加 PMSF 至细胞裂解液中，终浓度为 1mM；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 x g-10000 x g 离心 5min，立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融。

七：试剂准备

- 7.1 **洗涤液**：如果洗涤液（20×）有晶体析出，37℃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 **检测抗体**：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 990 μL 抗体稀释液进行配制，轻轻混匀。
- 7.3 **HRP 标记二抗浓缩液**：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 990 μL 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。细胞裂解液建议将总蛋白稀释至 50-300 ug/mL 使用。

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、HRP 标记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，分别设零孔和待测样本孔。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 检测抗体（1×）（参照试剂准备部分 7.2），盖上封板膜，37°C 孵育 1 h；

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 10-15 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。

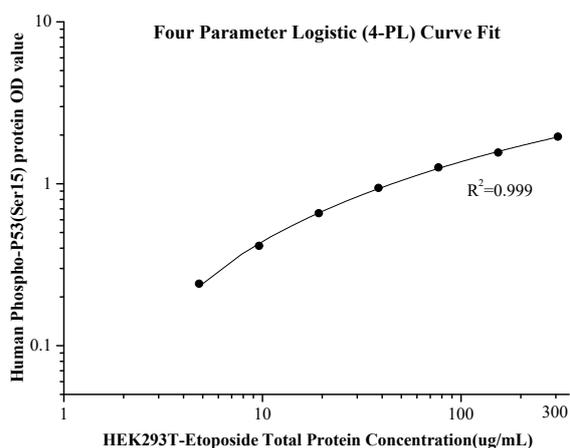
操作流程如下：

步骤	试剂	体积	孵育温度	孵育时间	洗涤次数
1	标准品或样本	100 μL	覆膜后 37°C 孵育	120 分钟	4 次
2	检测抗体（1×）	100 μL	覆膜后 37°C 孵育	60 分钟	4 次
3	HRP 标记二抗（1×）	100 μL	覆膜后 37°C 孵育	40 分钟	4 次
4	显色底物 TMB	100 μL	覆膜后 37°C 孵育，避光	10-15 分钟	不需要洗涤
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 450nm 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

以下提供的是阳性对照样本标准曲线，阳性对照样本取自经依托泊苷(Etoposide, 30 μ M, 4h, from MCE, Cat: HY-136293)处理的 HEK-293T 细胞。



total protein (ug/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.152	0.152	-
	0.151		
4.8	0.390	0.393	0.241
	0.395		
9.6	0.568	0.565	0.413
	0.561		
19.2	0.814	0.809	0.658
	0.804		
38.4	1.094	1.093	0.942
	1.092		
76.9	1.418	1.412	1.261
	1.406		
153.8	1.707	1.710	1.559
	1.713		
307.5	2.103	2.103	1.951
	2.102		

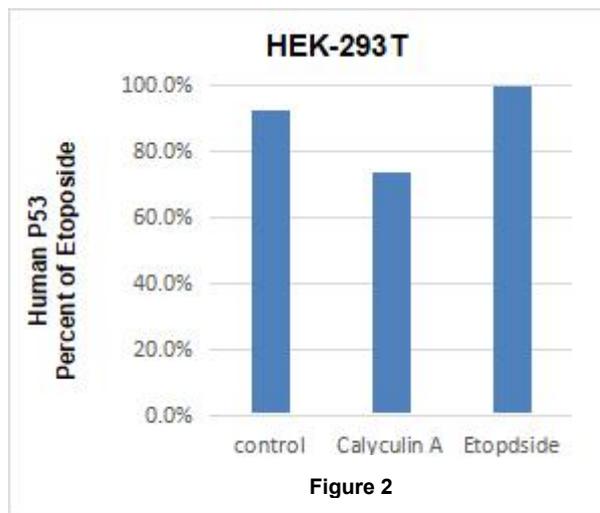
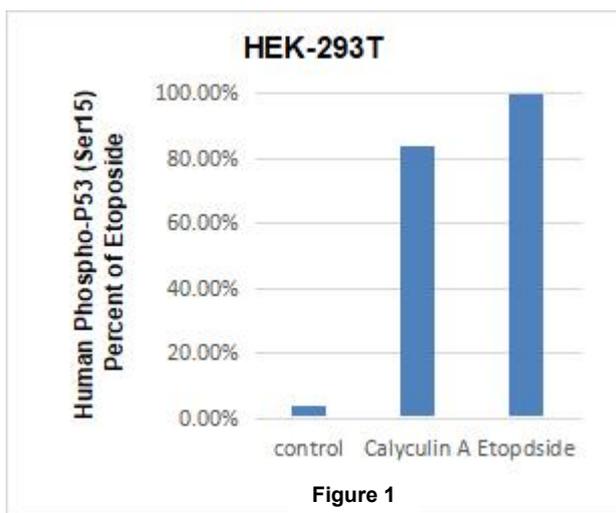
9.2 精密度

板内精密度：3 个不同浓度的样本在板内重复测定 20 次；

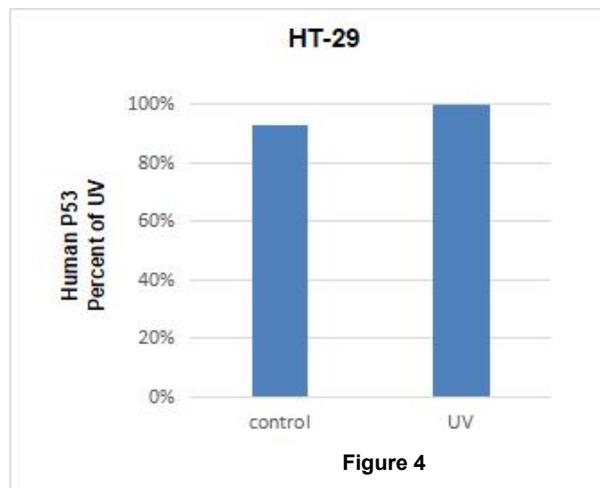
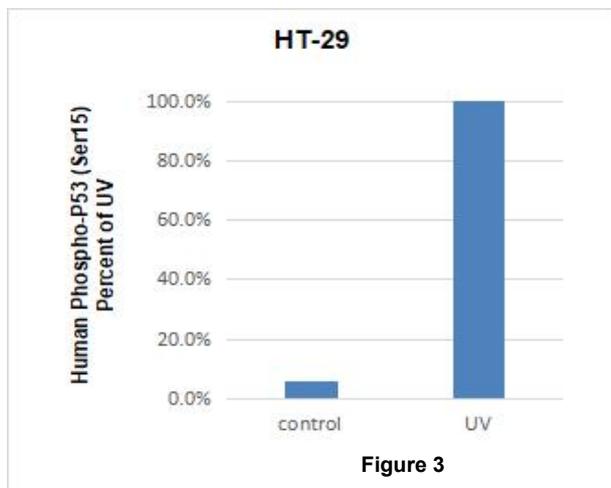
板间精密度：3 个不同浓度的样本在板间重复检测 24 次。

样本	板内精密度 (CV 内)		板间精密度 (CV 间)	
	1	2	1	2
数量	20	20	24	24
平均值 (ug/mL)	150.0	20.2	149.7	19.9
标准差	4.9	1.5	15.9	2.1
变异系数 CV%	3.3	7.4	10.6	10.6

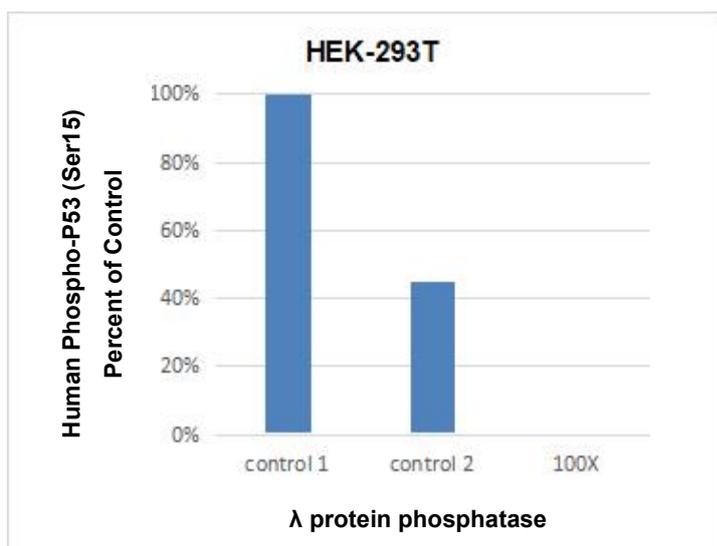
9.3 样本值



HEK-293T细胞经培养至细胞汇合度为70%-90%，将一部分不处理（作为control），一部分细胞用花萼海绵体诱癌素A(calyculin A, 100nM, 0.5h, from MCE, HY-18983)处理，一部分经过依托泊昔(Etoposide, 30 μ M, 4h, from MCE, Cat: HY-136293)处理，取细胞培养上清，制备裂解液，用KE40001检测Human Phospho-P53(Ser15)浓度，用KE00244检测Human total P53浓度。以经依托泊昔刺激的HEK-293T阳性裂解液为100%，通过标准曲线拟合计算得出calyculin A刺激HEK-293T样本和control样本相对表达水平（如图1和图2）。



HT-29细胞经培养至细胞汇合度为70%-90%，吸去一半培养基继续于培养皿中培养，作为对照样本（control）；另一半培养基开盖放置于无菌操作台，照紫外(UV)照射1h，收取细胞培养上清，制备裂解液。用KE40001检测Human Phospho-P53(Ser15)浓度，用KE00244检测Human total P53浓度。以紫外(UV)照射1h阳性裂解液为100%，通过标准曲线拟合计算得出对照样本的相对表达水平（如图3和图4）。



经依托泊苷刺激的HEK-293T细胞，制备裂解液时，对照样本1（Control 1）加入蛋白酶抑制剂和磷酸酶，对照样本2（Control 2）只加入裂解液裂解细胞，去磷酸化样本（100x）加入磷酸酶（λ protein phosphatase，100倍稀释），使用本试剂盒检测Phospho-P53(Ser15)的相对水平。

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Phospho-P53 (Ser15)的灵敏度为2.3 ug/mL。

十：参考文献

1. Wei, Jiangbin et al. "Transcriptome profiling of cells exposed to particular and intense electromagnetic radiation emitted by the "SG-III" prototype laser facility." *Scientific reports* vol. 11,1 2017. 21 Jan. 2021, doi:10.1038/s41598-021-81642-5
2. Zehbe, Ingeborg et al. "Rare human papillomavirus 16 E6 variants reveal significant oncogenic potential." *Molecular cancer* vol. 10 77. 24 Jun. 2011, doi:10.1186/1476-4598-10-77
3. Zhang, Liang et al. "Activated mitochondrial apoptosis in hESCs after dissociation involving the PKA/p-p53/Bax signaling pathway." *Experimental cell research* vol. 369,2 (2018): 226-233. doi:10.1016/j.yexcr.2018.05.024