

人连接黏附分子样蛋白酶联免疫吸附测定试剂盒

产品编号：MA0801 规格：96次

产品内容

产品组成	体积/数量
人 JAML 预包被板	8 孔条×12 个
样品稀释液	30mL
重组人 JAML 标准品(冻干)	2 支(10ng/支)
生物素标记人 JAML 抗体	130 μ L(效价 1:100)
抗体稀释液	12mL
酶复合物(HRP 标记的链霉亲和素)	130 μ L(效价 1:100)
酶复合物稀释液	12mL
浓缩洗涤液(25 \times)	30mL
显色剂 TMB	10mL
终止液	10mL
封板胶纸	4 张

产品简介

本试剂盒采用双抗体夹心ELISA法，用于检测样品中人JAML的浓度。人JAML捕获抗体已经预包被于酶标板上，当加入样品或标准品时，其中的人JAML会与捕获抗体结合，而其它游离成分则会通过洗涤被除去。接着，再加入生物素标记的人JAML抗体后，抗人JAML抗体与人JAML接合，形成夹心的免疫复合物，其它游离成分则通过洗涤被除去。随后加入酶复合物，生物素与酶复合物特异性结合，这样酶复合物上的HRP就与夹心的免疫复合物连接起来，而其它游离成分则通过洗涤被除去。最后加入显色剂，若样品中存在人JAML，则会形成免疫复合物，其上连接的HRP会催化无色的显色剂氧化生成蓝色物质，而后加入终止液，最终产物呈黄色。通过酶标仪检测，读取450nm处的OD值，人JAML浓度与OD450值之间呈正比，通过检测标准品绘制标准曲线，对照未知样品中OD值，即可计算出样品中人JAML的浓度。

连接黏附分子样蛋白(Junction adhesion molecule-like protein, JAML)，也称为AMICA，是一种位于白细胞质膜上的跨膜蛋白，通过与CXADR(相邻上皮细胞和内皮细胞上存在的受体)相互作用来控制白细胞的迁移和激活。这种相互作用在激活 γ - δ T细胞(一种存在于上皮细胞中的T细胞亚群)中发挥着至关重要的作用，有助于组织稳态和修复。与上皮CXADR结合后，JAML通过PI3激酶和MAP激酶启动 γ - δ T细胞中的下游信号传导，导致T细胞增殖以及刺激组织修复的细胞因子和生长因子的产生。JAML还通过与上皮和内皮CXADR的粘附相互作用来调节上皮和内皮组织内白细胞的迁移。在其同型二聚体形式中，JAML在介导白细胞-内皮细胞粘附方面特别活跃。此外，JAML与整合素 α -4/ β -1(ITGA4和ITGB1)相互作用，表明JAML通过控制JAML同二聚化在调节白细胞-内皮细胞粘附中发挥作用。



产品参数：

检测范围	62.5pg/mL~4,000pg/mL
敏感性	10pg/mL
特异性	系统和其它因子无交叉反应
样本类型	人血清、血浆、体液、组织匀浆或细胞培养上清

使用方法

（一）样品制备

1.根据样品种类选择相应的处理方法：

（1）细胞上清：将细胞培养上清液100~500×g离心5min，去除悬浮物后即可。

（2）血清样品：将全血在室温下静置0.5~2h，待其自然凝固并析出血清后，离心取黄色上清即可(4℃，1,000~2,000×g，10min)，注意请勿吸取沉淀，制备好的血清需置于冰上待用，请勿在其中添加任何防腐剂或抗凝剂；

（3）血浆样品：使用EDTA对全血进行抗凝处理后，混合均匀置于冰上，离心取黄色上清即可(4℃，1,000~2,000×g，10min)，注意请勿吸取沉淀，制备好的血浆需置于冰上待用；

（4）组织匀浆/体液：离心去除沉淀即可。

注意：

- ①若待测样品无法及时检测，样品制备完成后，请分装冻存于-20℃，避免反复冻融；
- ②请保证待测样品清澈透明，检测前如发现样品中有悬浮物，需通过离心去除；
- ③为了保证检测结果准确，请勿使用溶血、黄疸、高血脂或污染的样品。

2.稀释样本

查阅相关文献，预估样品中待测因子的含量，从而确定适当的稀释倍数，使稀释后样品中待测因子的浓度处于ELISA试剂盒的最佳检测范围。根据待测因子含量的不同，分别采取不同的稀释方案：

- （1）待测因子含量在40~400ng/mL范围内，一般按1:100稀释，即向297 μL样品稀释液中加入3 μL样品；
- （2）待测因子含量在4~40ng/mL范围内，一般按1:10稀释，即向225 μL样品稀释液中加入25 μL样品；
- （3）待测因子含量在62.5~4,000pg/mL范围内，一般按1:2稀释，即向100 μL样品稀释液中加入100 μL样品；
- （4）待测因子含量≤62.5pg/mL，样品一般无需稀释。

以上方案仅供参考，实验中请详细记录样品的稀释方法。

（二）检测准备工作

3.试剂盒自4℃冰箱取出后，请置于室温平衡20min；如从-20℃取出，各组分需彻底融化后再平衡20min；检测完成后，剩余试剂请及时置于4℃或-20℃保存。

4.将浓缩洗涤液(25×)用双蒸水或去离子水稀释成1×洗涤液。



5.重组人JAML标准品的稀释和使用(在使用前2h内准备, 室温操作, 请严格控制在25~28°C)

(1) 配制10ng/mL标准品: 取1mL样品稀释液加入标准品管内, 盖好后静置15min以上, 然后反复颠倒/搓动以助溶解;

(2) 配制4,000pg/mL标准品: 取400 μ L 10ng/mL的标准品加入有600 μ L样品稀释液的EP管中, 混匀, 做上标记;

(3) 按下表将4,000pg/mL标准品用样品稀释液进行倍比梯度稀释。(最高浓度为4,000pg/mL, 将标准品稀释液作为浓度0pg/mL。)

管号	稀释液用量(μ L)	复溶后标准品用量(μ L)	标准品的最终浓度(pg/mL)
A	0	1000	4,000
B	300	300(从A管取出)	2,000
C	300	300(从B管取出)	1,000
D	300	300(从C管取出)	500
E	300	300(从D管取出)	250
F	300	300(从E管取出)	125
G	300	300(从F管取出)	62.5
H	300	0	0

注意: 标准品复溶加样后, 剩余部分请丢弃。

6.准备生物素标记人JAML抗体工作液

(1) 按每孔需添加100 μ L抗体工作液, 计算其总用量(为弥补操作中的损耗, 需多配制100~200 μ L);

(2) 按1 μ L生物素标记人JAML抗体添加99 μ L抗体稀释液的比例配制工作液, 轻轻混匀。

7.准备酶复合物工作液(需在使用前1h内准备)

(1) 按每孔需添加100 μ L酶复合物工作液, 计算其总用量(为弥补操作中的损耗, 需多配制100~200 μ L);

(2) 按1 μ L酶复合物添加99 μ L酶复合物稀释液的比例配制工作液, 轻轻混匀。

(三) 检测流程

8.通过计算确定一次实验所需的板条数, 取出所需板条放置于框架内, 多余的板条请放回铝箔袋密封, 保存于4°C或-20°C。

注意:

①标准品和样品建议做双复孔检测;

②每次实验均需绘制标准曲线。

9.将用样品稀释液稀释后的样品和不同浓度标准品(100 μ L/孔)分别加入相应孔中, 用封板胶纸封住反应孔, 37°C孵育90min。

注意:

①请查阅相关文献确定样品中待检测蛋白的大致浓度, 若其大于本试剂盒标准曲线的最大标准品浓度, 请将样品适当稀释后再进行检测;

②整个加样过程不宜超过10min, 否则可能会影响检测结果。

10.甩去酶标板内液体, 无需洗板, 将板倒扣在吸水纸上拍干。



11.加入稀释后的生物素标记人JAML抗体工作液(100 μ L/孔),用封板胶纸封住反应孔,37 $^{\circ}$ C孵育60min。

12.洗板5次,每孔1 \times 洗涤液用量为300 μ L,注入与吸出间隔15~30s,洗完后将板倒扣在吸水纸上拍干。

注意: 洗涤过程至关重要,洗涤不充分会导致结果产生较大误差。

13.加入稀释后的酶复合物(100 μ L/孔),用封板胶纸封住反应孔,37 $^{\circ}$ C避光孵育30min。

14.洗板5次,方法同步骤12;

15.加入显色剂TMB(100 μ L/孔),用封板胶纸封住反应孔,避光37 $^{\circ}$ C反应10~25min。注意:

①在保存和使用时,请勿将TMB接触氧化剂和金属;

②因实验室条件差异,最佳显色时间会有所不同,反应充分时肉眼可见标准品的前3~4孔有明显的梯度蓝色。

16.加入终止液(100 μ L/孔),混匀后即刻使用酶标仪测量OD450,同时设定540nm或570nm作为校正波长,即可计算得到校正吸光度值(OD450-OD540或OD450-OD570);

注意: 读取OD值建议在10min内完成。

(四) 数据分析

17.绘制标准曲线。以标准品浓度作横坐标,OD值作纵坐标,利用计算机软件作四参数逻辑(4-PL)曲线拟合创建标准曲线,通过样品的OD值即可在标准曲线上计算出其相应浓度。

注意:

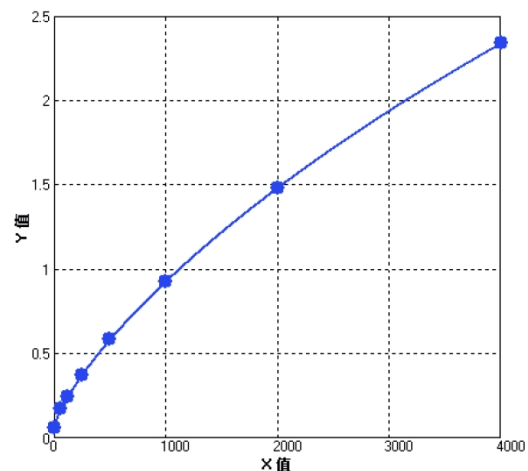
①复孔OD值在20%的差异范围内结果才有效,复孔OD值取平均后可作为测量值;

②若样品OD值高于标准曲线上限,应适当稀释后重测,计算浓度时应乘以稀释倍数。

标准曲线范例

人JAML参考标准曲线

标准品浓度	O.D.
0 pg/mL	0.063
62.5 pg/mL	0.172
125 pg/mL	0.248
250 pg/mL	0.374
500 pg/mL	0.584
1,000 pg/mL	0.930
2,000 pg/mL	1.483
4,000 pg/mL	2.339



注意: 本图仅供参考,应以同次试验标准品所绘标准曲线计算样品含量。

保存条件



2~8℃保存，自生产之日起6个月有效；长期储存请置于-20℃，自生产之日起12个月有效。

注意事项

1. 浓缩洗涤液低温情况下可能会出现结晶，请水浴加热使结晶完全溶解后再配制工作液；
2. 严禁混用不同批号试剂盒的组分；
3. 加样过程请避免产生气泡，实验操作过程中一定要保证试剂充分混匀，否则会使结果产生较大误差；
4. 说明书中提到的室温条件，请严格控制在25~28℃；
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；
6. 本产品仅限科研使用。

J240101

