

人颗粒酶 A 酶联免疫吸附测定试剂盒

产品编号: MA1140 规格: 96 次

产品内容

产品组成	体积/数量
人 Granzyme A 预包被板	8 孔条×12 个
样品稀释液	30 mL
重组人 Granzyme A 标准品(冻干)	2 支(10 ng/支)
生物素标记人 Granzyme A 抗体	130 μL(效价 1:100)
抗体稀释液	12 mL
酶复合物(HRP 标记的链霉亲和素)	130 μL(效价 1:100)
酶复合物稀释液	12 mL
浓缩洗涤液(25×)	30 mL
显色剂 TMB	10 mL
终止液	10 mL
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 Granzyme A 的浓度。人 Granzyme A 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 Granzyme A 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 Granzyme A 抗体后, 抗人 Granzyme A 抗体与 人 Granzyme A 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 Granzyme A, 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 450 nm 处的 OD 值, 人 Granzyme A 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 Granzyme A 的浓度。

Granzyme A (颗粒酶 A) 是一种由细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 和自然杀伤 (NK) 细胞合成并储存在 细胞毒性颗粒中的丝氨酸蛋白酶, 在免疫突触形成后通过穿孔素依赖途径进入靶细胞, 通过切割组蛋白、核纤层蛋白等多种底物诱导靶细胞发生不依赖 caspase 的凋亡或死亡, 在机体抗病毒、抗肿瘤及清除异常细胞的免疫防御中发挥重要作用。



产品参数:

检测范围	15.62 pg/mL~1,000 pg/mL
敏感性	5.5 pg/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.稀释样品

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 10~100 ng/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 1~10 ng/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 15.62~1,000 pg/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≤15.62 pg/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 Granzyme A 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℃)

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

(2) 配制 1,000 pg/mL 标准品: 取 100 µL 10 ng/mL 的标准品加入有 900 µL 样品稀释液的 EP 管中, 混匀, 做上标记;

(3) 按下表将 1,000 pg/mL 标准品用样品稀释液进行倍比梯度稀释。(最高浓度为 1,000 pg/mL, 将标准品稀释液作为浓度 0 pg/mL。)

管号	稀释液用量(µL)	复溶后标准品用量(µL)	标准品的最终浓度(pg/mL)
A	0	1000	1,000
B	300	300(从A管取出)	500
C	300	300(从B管取出)	250
D	300	300(从C管取出)	125
E	300	300(从D管取出)	62.5
F	300	300(从E管取出)	31.25
G	300	300(从F管取出)	15.62
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 Granzyme A 抗体工作液 (需在使用前 1 h 内准备)

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

(2) 按1µL生物素标记人 Granzyme A 抗体添加99µL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 1 h 内准备)

(1) 按每孔需添加 100 µL 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 µL);

(2) 按 1 µL 酶复合物 添加 99 µL 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℃或-20℃。

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(100µL/孔)分别加入相应孔中, 用封板胶纸封住反应孔, 37℃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 Granzyme A 抗体工作液(100 μ L/孔)，用封板胶纸封住反应孔，37℃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℃避光孵育 30 min；
- 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℃反应 10~25 min。
- 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。**

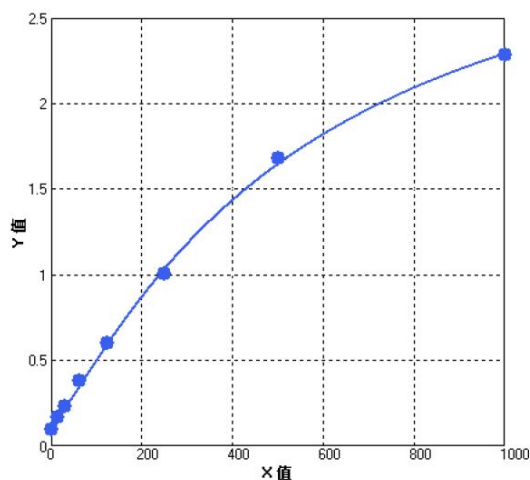
(四) 数据分析

- 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 Granzyme A 参考标准曲线

标准品浓度	O.D.
0 pg/mL	0.097
15.62 pg/mL	0.170
31.25 pg/mL	0.231
62.5 pg/mL	0.377
125 pg/mL	0.597
250 pg/mL	1.007
500 pg/mL	1.680
1,000 pg/mL	2.284



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。

S260801

