人 CD16 酶联免疫吸附测定试剂盒

产品编号：MA1149 规格：96 次

产品内容

产品组成	体积/数量
人 CD16 预包被板	8 孔条×12 个
样品稀释液	30 mL
重组人 CD16 标准品(冻干)	2 支(200 ng/支)
生物素标记人 CD16 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 CD16 的浓度。人 CD16 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 CD16 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 CD16 抗体后，抗人 CD16 抗体与人 CD16 结合，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 CD16，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 CD16 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 CD16 的浓度。

CD16（FcγRIII）是免疫球蛋白超家族中的 IgG 低亲和力 Fc 受体，存在两种亚型：跨膜型 CD16a（Fc γRIIIa）主要表达于 NK 细胞、单核 / 巨噬细胞及胎盘滋养层细胞，需与 FcεRIγ或 CD3ζ链结合以实现信号转导；GPI 锚定型 CD16b（FcγRIIIb）则特异性高表达于中性粒细胞，两者胞外域高度同源但信号机制不同。CD16 通过识别 IgG 抗体 Fc 段或免疫复合物介导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性（ADCC），是连 接先天与适应性免疫的关键桥梁，其中约 90%的 CD56dim NK 细胞高表达 CD16 而专精于细胞毒功能，CD56bright 亚群则低表达 CD16 而以免疫调节为主。其表达受 ADAM17 介导的脱落及免疫复合物交联 等机制严格调控，以防止过度免疫反应；临床上，FcγRIIIa-158V/F 多态性显著影响治疗性抗体（如利妥昔单抗）的 ADCC 疗效，FcγRIIIb-NA1/NA2 多态性与系统性红斑狼疮易感性及免疫复合物清除相关，而 CD16 基因突变可导致原发性免疫缺陷，在急性髓系白血病中 CD56 阴性 CD16 阳性 NK 细胞的异常扩增还与不良预后密切相关。

产品参数：

检测范围	31.25 pg/mL~2,000 pg/mL
敏感性	12 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 20~200 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 2~20 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 31.25~2,000 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≤31.25 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 CD16 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 200 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 2,000 pg/mL 标准品：取 10 μL 200 ng/mL 的标准品加入有 990 μL 样品稀释液的 EP 管中，混匀，做上标记；

（3）按下表将 2,000 pg/mL 标准品用样品稀释液进行倍比梯度稀释。(最高浓度为 2,000 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	2,000
B	300	300(从A管取出)	1,000
C	300	300(从B管取出)	500
D	300	300(从C管取出)	250
E	300	300(从D管取出)	125
F	300	300(从E管取出)	62.5
G	300	300(从F管取出)	31.25
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 CD16 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 CD16 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 CD16 抗体工作液(100μL/孔)，用封板胶纸封住反应孔，37℃孵育60min。

12.洗板5次，每孔1×洗涤液用量为300μL，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 μL/ 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 μL/ 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(100μL/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：

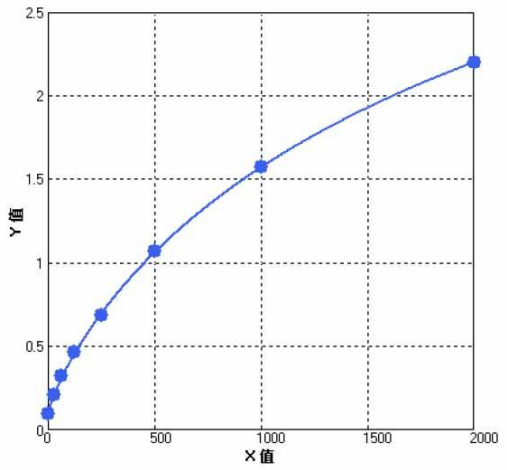
①复孔OD值在20%的差异范围内结果才有效，复孔OD值取平均后可作为测量值；

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 CD16 参考标准曲线

标准品浓度	O.D.
0 pg/mL	0.098
31.25 pg/mL	0.211
62.5 pg/mL	0.321
125 pg/mL	0.468
250 pg/mL	0.684
500 pg/mL	1.072
1,000 pg/mL	1.575
2,000 pg/mL	2.202



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。

S260901

