产品货号: EKT10174

产品规格: 96T/48T

检测范围: 1.88-120 pg/mL

灵敏度: 0.20 pg/mL

人弹性蛋白酶特异性抑制剂酶联免疫吸附测定试剂盒

Human ESI (Elastase-specific inhibitor) ELISA Kit

本试剂盒仅用于科学研究 不用于临床诊断

使用前请仔细阅读产品说明书，如有问题，可通过以下方式联系我们：

订购热线: 0571-87000691

技术支持邮箱: service@diagbio.com

公司网址: www.diagbio.com

目 录

一、背景介绍 1

二、检测原理 1

三、产品组成及储藏条件 1

四、产品注意事项 2

五、不同样本的前处理 2

六、实验准备 2

七、操作步骤 4

八、典型数据 6

一、背景简介

Human ESI 是一种小分子丝氨酸蛋白酶抑制剂，可作为抗菌肽对抗革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌及真菌病原体。该蛋白含 WAP 型四二硫键核心结构域，属于 WFDC 结构域家族，基因定位于染色体 20q12-q13 的着丝粒簇。其表达受细菌脂多糖和细胞因子上调。Elafin 主要存在于皮肤、肺等黏膜表面，通过抑制中性粒细胞弹性蛋白酶参与炎症调控与组织保护，在感染与炎症性疾病研究中具有重要价值。

二、检测原理

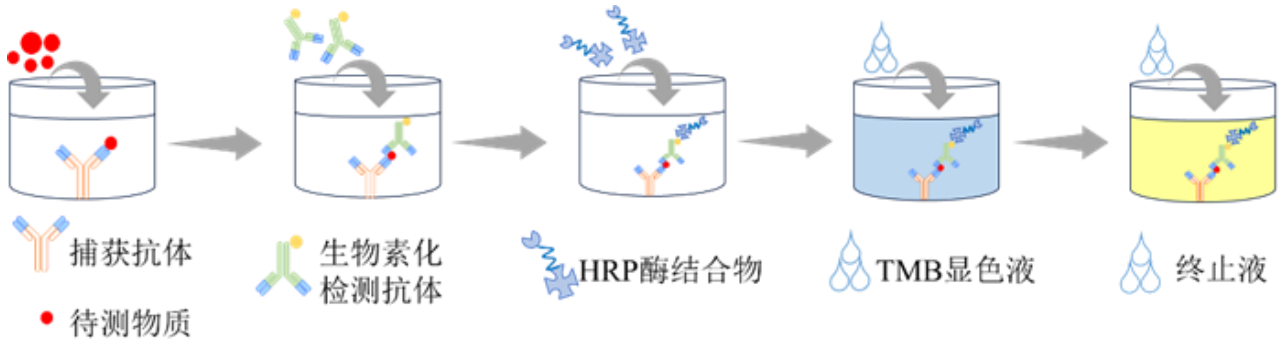


图 1：夹心法模式图

捕获抗体提前包被于 96 孔板上，操作顺序如上图所示。TMB 经 HRP 酶催化后显蓝色，在酸性终止液的作用下转变成黄色，最后用酶标仪读取 OD450nm 处的吸光度值，OD 值的大小与样品（或标准品）中待测物的浓度正相关，以标准品浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，绘制标准曲线，通过标准曲线准确计算样品中待测物的浓度。

三、产品组成及储藏条件

中英文名称	规格（96T）	规格（48T）	储藏条件
ELISA 酶标板	8*12	4*12	2~8 ℃
标准品	2 Vial	1 Vial	2~8 ℃
标准品&样品稀释液	1 Vial: 20 mL	1 Vial: 10 mL	2~8 ℃
生物素化检测抗体（100X）	1 Vial: 60 μL	1 Vial: 30 μL	2~8 ℃
HRP 酶结合物（100X）	1 Vial: 60 μL	1 Vial: 30 μL	2~8 ℃
生物素化抗体稀释液	1 Vial: 6 mL	1 Vial: 3 mL	2~8 ℃
HRP 酶结合物稀释液	1 Vial: 6 mL	1 Vial: 3 mL	2~8 ℃
浓缩洗液（20X）	1 Vial: 20 mL	1 Vial: 10 mL	2~8 ℃
TMB 显色液	1 Vial: 12 mL	1 Vial: 6 mL	2~8 ℃
终止液	1 Vial: 12 mL	1 Vial: 6 mL	2~8 ℃
封板膜	5 张	5 张	2~8 ℃

试剂盒不包括以下材料，请自备

1）酶标仪（450 nm 波长滤光片）、摇床。

2）高精度移液枪、离心管、一次性枪头（10 μL, 100 μL, 200 μL, 300 μL, 1000 μL）、加样槽、吸水纸。

3）双蒸水或去离子水。

四、产品注意事项

1）实验过程中要做好充足地保护措施（如穿白大褂，佩戴护目镜等）；

2）请勿混用其他批号或其他来源的试剂，过期试剂请勿使用；

3）标准品冻干粉、生物素化检测抗体、HRP 酶结合物含量较少，使用前应短暂离心，且标准品冻干粉在复溶后应尽快使用；

4）建议标准品和样品设置复孔，操作过程中保证试剂加样顺序一致，且每次实验均需重新绘制标准曲线；

5）避免皮肤接触显色液和终止液，终止液加入地顺序要完全和显色液加入地顺序一致；

6）正式实验前应进行预实验，若样品的浓度高于标准品的最高浓度，应对样品进行适当地稀释。

五、不同样本的前处理

1）细胞培养上清：将细胞培养上清转移到无菌的离心管内，离心（3000 r/min, 10 min, 4 ℃）取上清液待测。

2）血清样本：新鲜收集的全血样本在室温下静置 2 h 或 2~8 ℃过夜，离心（3000 r/min, 10 min, 4 ℃）取上清液待测。

3）血浆样本：将新鲜收集的全血样本加入含抗凝剂（EDTA/柠檬酸/肝素）的离心管内，混匀，离心（3000 r/min, 10 min, 4 ℃）取上清待测。

4）组织匀浆：用预冷的 PBS 缓冲液（0.01 M，pH7.4）清洗组织，称重后剪碎，加入研磨缓冲液（一般为 PBS，推荐每 1 g 动物组织加入 9 mL PBS，具体比例可根据实际实验需求进行调整），在冰浴条件下进行研磨，得到的组织匀浆可通过超声破碎或反复冻融进一步处理。将制备好的匀浆液离心（5000 r/min, 10 min, 4 ℃）后取上清液待测。

六、实验准备

1）试剂回温

实验前半个小时左右，将保存在 2~8 ℃的试剂盒拿出平衡至室温。如果试剂盒需要多次使用，仅取出本次实验所需的酶标板和试剂，剩余的酶标板和试剂按照规定的条件贮存，不同试剂盒内的试剂请勿混用。

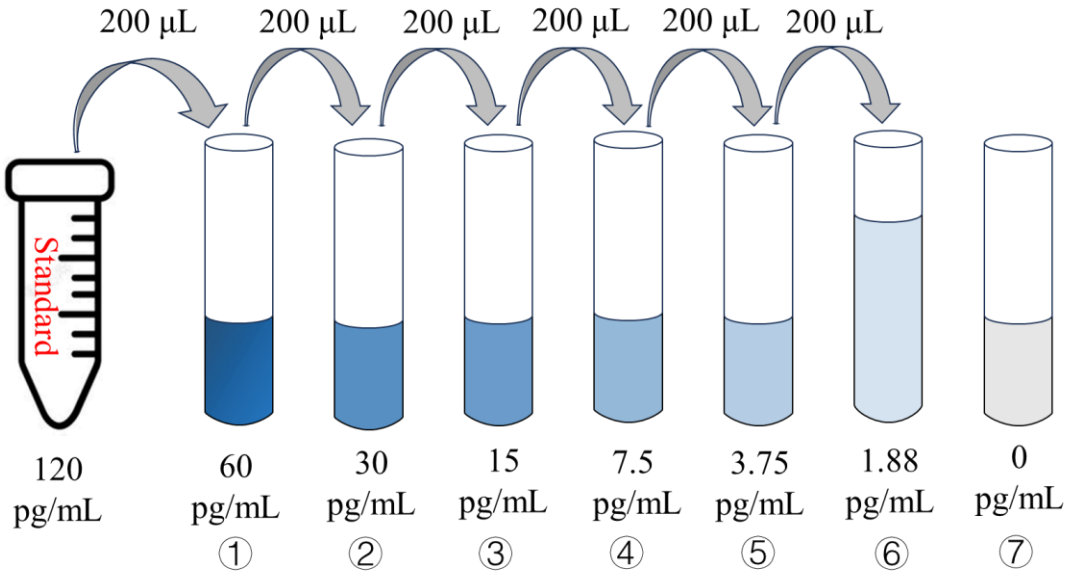
2）洗液（1X）

用双蒸水或去离子水按照 1: 19 的比例稀释 20 X 浓缩洗液。从冰箱内取出的浓缩洗液若出现结晶属于正常现象，不影响后续实验结果，可用 40 ℃的水浴微微加热使结晶完全溶解后配制洗液。

3）标准品梯度稀释过程

开盖前对标准品冻干粉进行简短离心，加入 1 mL 标准品&样品稀释液后静置 3 min 左右，用高精度移液枪缓慢吹打或使用低速涡旋仪使其充分溶解。建议标准品的浓度梯度设置为 120、60、30、15、7.5、3.75、1.88、0 pg/mL。

标准品倍比稀释步骤：取 7 支离心管标记好顺序，每管中加入 200 μL 标准品&样品稀释液，从原液（120 pg/mL）中取出 200 μL 加入第一支试管后充分混匀，再从第一支试管取出 200 μL 加入到第二支试管，以此类推，第七支试管为 200 μL 标准品&样品稀释液，具体操作图示如下：



4）生物素化检测抗体（1X）

实验前计算好生物素化检测抗体工作液的用量（50 μL /孔），实际配制时应多配制 100-200 μL。使用前对生物素化检测抗体（100X）进行简短离心，用生物素化抗体稀释液进行稀释（例：1 μL100X 生物素化检测抗体+99 μL 生物素化抗体稀释液），注意现配现用。

5）HRP 酶结合物（1X）

实验前计算好 HRP 酶结合物工作液的用量（50 μL /孔），实际配制时应多配制 100-200 μL。使用前对 HRP 酶结合物（100X）进行简短离心，用 HRP 酶结合物稀释液进行稀释（例：1 μL100X HRP 酶结合物+99 μL HRP 酶结合物稀释液），注意现配现用。

6）样品稀释

如果待测样品需要进行稀释，请用试剂盒提供的标准品&样品稀释液稀释血清/血浆/组织样本，用细胞培养基稀释细胞培养上清。

七、操作步骤

1）设定标准孔、样品孔、空白孔。标准孔加入 50 μL 倍比稀释的标准品溶液，空白孔加入 50 μL 标准品&样品稀释液，其余样品孔加入 50 μL 处理好的样品溶液，覆膜（吸附上按压几下），摇床（60 r/min）上室温孵育 2 h；

2）甩干孔内液体，在洁净的吸水纸上拍干，每孔加入 275 μL1X 洗液，浸泡 3 min 后甩干孔内洗液，拍干，此步骤重复三次；

3）每孔加入 50 μL 稀释好的生物素化检测抗体工作液，覆膜，摇床（60 r/min）上室温孵育 1 h；

4）甩干孔内液体，洗板 3 次，同步骤 2；

5）每孔加入 50 μL 稀释好的 HRP 酶结合物工作液，覆膜，摇床（60 r/min）上室温孵育 1 h；

6）甩干孔内液体，洗板 3 次，同步骤 2；

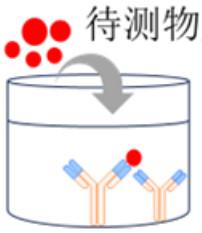
7）每孔加入 100 μL TMB 显色液，常温下避光反应 5~15 min。注：具体反应时间可根据实际实验现象调整。

8）每孔加入 100 μL 终止液。注：终止液加入地顺序要和 TMB 显色液加入地顺序一致，加入后轻微震荡酶标板，确保溶液混合均匀。

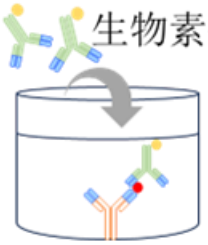
9）立即用酶标仪在 450 nm 波长测量各孔的光密度(OD 值)。

10）数据分析：每个标准品或样品的 OD 值减去空白孔的 OD 值，取平均值，以标准品的浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，使用 Origin、ELISACalc 等软件进行四参数拟合，根据拟合出的标准曲线计算出样本浓度（若样本进行稀释处理，还需乘以稀释倍数）。

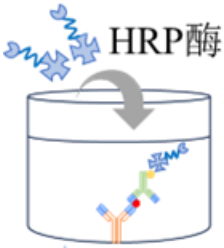
操作流程图



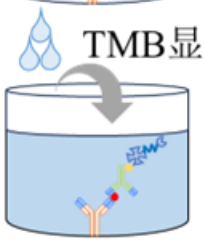
1、向96孔板内加入50 μL标准品、样品及标准品&样品稀释液，覆膜，摇床（60 r/min）上室温孵育2 h。



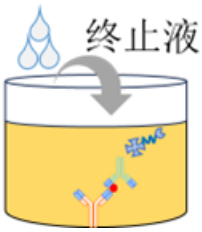
2、甩干孔内液体，拍干，用1X洗液洗板三次。每孔加入50 μL稀释好的生物素化检测抗体工作液，覆膜，摇床（60 r/min）上室温孵育1 h。



3、甩干孔内液体，拍干，用1X洗液洗板三次。每孔加入50 μL稀释好的HRP酶结合物工作液，覆膜，摇床（60 r/min）上室温孵育1 h。



4、甩干孔内液体，拍干，用1X洗液洗板三次。每孔加入100 μLTMB显色液，室温下避光孵育5~15 min 。



5、每孔加入100 μLTMB终止液，轻轻震荡混匀，用酶标仪在 450 nm 波长测量各孔的OD值。

八、典型数据

标准曲线范例：以下数据和曲线仅供参考，实验人员每次实验均需建立标准曲线

