（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

产品货号：E-BC-K899-M

产品规格：48T (32 samples)/ 96T(80 samples)

检测仪器：酶标仪(370-390 nm)

Elabscience®中性粒细胞弹性蛋白酶（NE）比色法测试盒

Neutrophil Elastase (NE) Activity Colorimetric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测动物组织样本中的中性粒细胞弹性蛋白酶（NE）活力。

检测原理

中性粒细胞弹性蛋白酶（Neutrophil Elastase, NE）是中性粒细胞分泌的主要丝氨酸蛋白酶之一。在机体的生理和病理过程中具有重要作用，一方面 NE 参与构成机体防御系统，协助清除病原微生物；另一方面，NE 过度激活，在与内源性抑制剂之间失衡的情况下，直接参与组织损伤，与多种炎症相关疾病的发生密切相关，如动脉粥样硬化、慢性阻塞性肺疾病，肺囊肿性纤维化等疾病，可作为这些疾病的防治靶点。

本试剂盒的检测原理是：NE 将底物水解，生成显色物质，在波长 380 nm 处有最大吸收，通过测定 380 nm 处的 OD 值大小和标准曲线计算样本中 NE 活力。

本试剂盒检测动物组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 (Extraction Solution)	40 mL × 1 瓶	40 mL × 2 瓶	-20ºC 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	缓冲液 (Buffer Solution)	10 mL × 1 瓶	20 mL × 1 瓶	-20ºC 避光保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	底物 (Substrate)	0.42 mL × 1 支	0.84 mL × 1 支	-20ºC 避光保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	还原试剂 (Reducing Reagent)	0.55 mL × 1 支	1.1 mL × 1 支	-20ºC 避光保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	终止剂 (Stop Solution)	1.1 mL × 1 支	2.2 mL × 1 瓶	-20°C 避光保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	10 mmol/L 标准品溶液 (10 mmol/L Standard Solution)	0.1 mL × 1 支	0.1 mL × 1 支	-20°C 避光保存 6 个月
	96 孔酶标板	48 孔×1 块	96 孔×1 块	无要求
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(370-390 nm，最佳检测波长 380 nm)，恒温箱。

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至25°C，试剂三、四、六使用前需将液体离心至管底。

② 试剂三工作液的配制：

将试剂三：试剂二按体积比= 1：19配制，按需配制，现配现用，4 h内使用有效。

③ 1 mmol/L标准品溶液的配制：

将试剂六：试剂二按体积比= 1：9配制，未用完的1 mmol/L标准品溶液可2-8°C保存1个月。

④ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(mmol/L)	**0**	**0.2**	**0.3**	**0.4**	**0.5**	**0.6**	**0.7**	**1.0**
1 mmol/L 标准品(μL)	0	40	60	80	100	120	140	200
试剂二(μL)	200	160	140	120	100	80	70	0

样本准备

① 样本处理

组织样本：按照组织样本质量(g)：试剂一体积(mL) = 1：9的比例匀浆，4ºC，12000 × g离心10 min，取上清液，置于冰上待测，当天检测有效。留取部分上清，进行蛋白浓度测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.54 - 28.57 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%小鼠胰腺组织	5-15	10%小鼠胃组织	不稀释
10%小鼠小肠组织	不稀释		

注：稀释液为试剂一。

实验关键点

试剂一、二、五在吸打过程中容易产生泡沫，建议在使用时移液枪小心吸打。

操作步骤

① 标准孔：取 20 μL 不同浓度的标准品溶液，分别加入相应的酶标孔中。
测定孔：取 20 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。

② 向步骤①中的各孔加入 10 μL 试剂四。

③ 向步骤②中的各孔加入 150 μL 试剂三工作液。

④ 振板 5 s，酶标仪 380 nm 波长下检测测定孔 OD 值，记录为 A_1。

⑤ 37°C，避光孵育 35 min。

⑥ 向步骤⑤中各孔加入 20 μL 试剂五。振板 5 s，酶标仪 380 nm 波长下检测各孔 OD 值，记录为 A_2。

操作表

	标准孔	**测定孔**
不同浓度的标准品溶液(μL)	20	--
待测样本(μL)	--	20
试剂四(μL)	10	10
试剂三工作液(μL)	150	150
振板 5 s，酶标仪 380 nm 波长下检测测定孔 OD 值，记录为 A_1。37°C，避光孵育 35 min。		
试剂五(μL)	20	20
振板 5 s，酶标仪 380 nm 波长下检测各孔 OD 值，记录为 A_2。		

本试剂盒检测动物组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

结果计算

标准品拟合曲线：y = ax + b

组织样本中中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)活力计算公式：

定义：37°C 条件下，每克组织蛋白在反应体系中每分钟生成 1 μmol 3-磷酸甘油定义为一个酶活力单位。

$$\text{NE 活力 (U/gprot)} = (\Delta A - b) \div a \div C_{pr} \times f \div T \times 1000^*$$

注解:

y：标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值，标准曲线以标准孔 A_2 值进行拟合)

x：标准品的浓度

a：标曲的斜率

b：标曲的截距

ΔA：测定孔 $A_2 - A_1$

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

C_{pr}：匀浆后样本蛋白浓度，gprot/L

T：反应时间，35 min

1000*：1 mmol/L=1000 μmol/L

附录1 关键数据

1. 技术参数

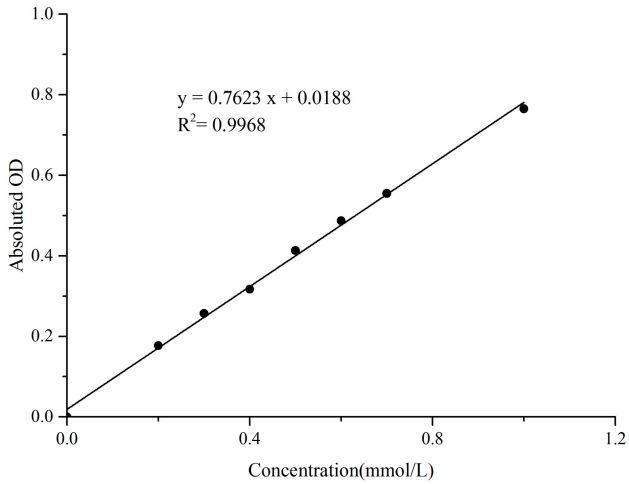
检测范围	0.54-28.57 U/L	**批间差**	6.3-7.5%
灵敏度	0.54 U/L	**批内差**	4.1-5.0%
稀释回收率	98-100%		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量20 μL，按照操作步骤进行实验，OD值如下表所示：

标准品浓度 (mmol/L)	**0**	**0.2**	**0.3**	**0.4**	**0.5**	**0.6**	**0.7**	**1.0**
A_2	0.270	0.450	0.543	0.607	0.683	0.726	0.820	1.054
	0.270	0.444	0.511	0.568	0.683	0.789	0.831	1.016
平均 A_2 值	0.271	0.447	0.527	0. 588	0.683	0.758	0.826	1.035
绝对 A_2 值	0	0.177	0.257	0.317	0.413	0.487	0.555	0.765

② 绘制标曲(如下图)：



附录2 实例分析

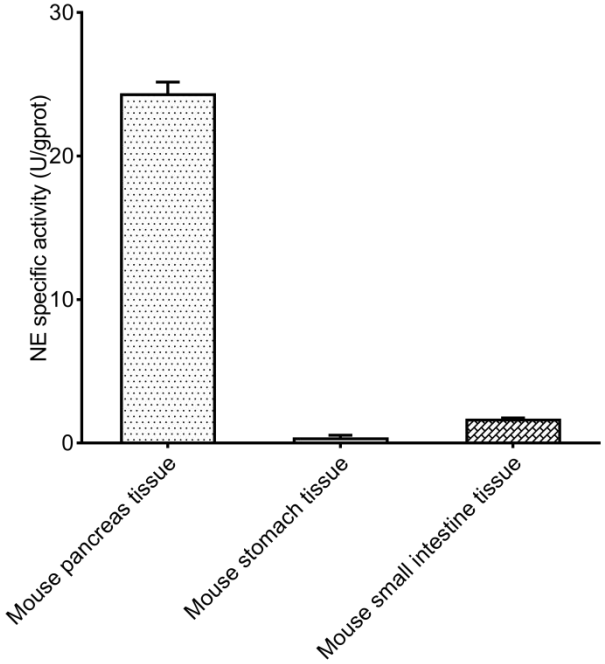
例如小鼠胰腺组织(数据仅供参考)：

取20 μL稀释5倍的10%小鼠胰腺组织匀浆上清加入到酶标板孔中，按操作表操作，结果如下：标准曲线：$y = 0.7623\ x + 0.0188$，测定孔的A_1值为0.383，A_2值为1.120，$\Delta A = A_2 - A_1 = 1.120 - 0.383 = 0.737$，10%小鼠胰腺组织匀浆蛋白浓度为5.70 gprot/L，计算结果为：

$$\text{NE活力 (U/gprot)} = (0.737 - 0.0188) \div 0.7623 \times 5 \div 35 \div 5.7 \times 1000$$

$$= 23.61\ \text{U/gprot}$$

按说明书操作，测定小鼠胰腺组织样本(10%组织匀浆蛋白浓度5.7 gprot/L，加样量 20 μL)、小鼠胃组织样本(10%组织匀浆蛋白浓度4.12 gprot/L，加样量 20 μL)、小鼠小肠组织样本(10%组织匀浆蛋白浓度7.43 gprot/L，加样量 20 μL)中的 NE 酶活(如下图)：



声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。