

(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-K884-M

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

检测仪器：酶标仪(360 - 400 nm)

Elabscience®NETosis 比色法测试盒

NETosis 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：<http://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细胞样本的 NETosis 的发生程度。

检测原理

NETosis 是中性粒细胞的炎性细胞死亡方式。活化的中性粒细胞通过向细胞外释放由解聚的染色质和细胞内颗粒蛋白组成的细胞捕获网 (Neutrophil extracellular traps, NETs), 以捕获和杀死病原体。在 NETs 形成过程中伴随着中性粒细胞的死亡, 这种新型的死亡方式不同于细胞凋亡和细胞坏死, 被称为 NETosis。NETosis 的发生有多种诱导物, 如病原体(细菌、真菌、病毒等)、活化的血小板、趋化因子(白细胞介素、粒细胞集落刺激因子、转化生长因子 β 等)、人工成分和钙离子载体等, 这些诱导物可以促进 NETosis 关键蛋白中性粒细胞弹性蛋白酶(Neutrophil Elastase, NE)、髓过氧化物酶(Myeloperoxidase, MPO)和肽基精氨酸脱亚氨酶 IV (Peptidearginine Deaminase 4, PAD4)的转录和翻译。

本试剂盒通过检测 NE 的活性, 进而检测 NETosis 的发生程度。

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)	蛋白试剂 (Protein Reagent)	1.2 g×1 瓶	2.4 g×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	盐溶液 (Saline Solution)	0.12 mL×1 支	0.24 mL×1 支	-20°C 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	PMA 储备液 (PMA Stock Solution)	0.01 mL×1 支	0.02 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	A23187 储备液 (A23187 Stock Solution)	0.02 mL×1 支	0.04 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	清除剂 (Scavenger)	0.02 mL×1 支	0.04 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	终止液 (Stop Solution)	0.55 mL×1 支	1.1 mL×1 支	-20°C 保存 6 个月
试剂七 (Reagent 7)	底物 (Substrate)	0.55 mL×1 支	1.1 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂八 (Reagent 8)	缓冲液 (Buffer Solution)	5.5 mL×1 瓶	11 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂九 (Reagent 9)	55 mmol/L 标准品溶液 (55 mmol/L Standard Solution)	0.06 mL×1 支	0.06 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(360–400 nm，最佳检测波长 380 nm)、涡旋混匀仪、
恒温箱

试剂：基础培养基、二甲基亚砷(DMSO)

耗材：0.22 μm 滤膜、注射器

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至25°C。

② 分析缓冲液的配制：

量取100 mL基础培养基，向其中加入1 g试剂一和0.1 mL试剂二，搅拌溶液，用0.22 μm 滤膜过滤后分装置于2-8°C灭菌环境待用，可2-8°C保存2周。

③ PMA工作液的配制：

按试剂三：分析缓冲液=1：4999的比例配制（例如配制5 mL的PMA工作液，用4.999 mL的分析缓冲液稀释0.001 mL的试剂三），未使用的溶液-20°C避光可保存3天。

④ A23187工作液的配制：

按试剂四：分析缓冲液=1：99的比例配制（例如配制1 mL的A23187工作液，用0.99 mL的分析缓冲液稀释0.01 mL的试剂四），未使用的溶液-20°C避光可保存3天。

⑤ 试剂五工作液的配制：

按试剂五：分析缓冲液=3：497的比例配制（例如配制0.5 mL的试剂五工作液，用0.497 mL的分析缓冲液稀释0.003 mL的试剂五），现配现用。

⑥ 试剂七工作液的配制：

按试剂七：DMSO=1：3的比例配制成试剂七储备液，再按试剂七储备液：试剂八 =2：3的比例配制成试剂七工作液，未使用的溶液2-8°C避光可保存3天。

⑦ 550 $\mu\text{mol/L}$ 标准品溶液的配制：

取10 μL 试剂九，加入990 μL 双蒸水稀释混匀，未使用的溶液2-8°C避光可保存一周。

⑧ 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 ($\mu\text{mol/L}$)	0	110	220	275	330	385	440	550
550 $\mu\text{mol/L}$ 标准品 溶液 (μL)	0	40	80	100	120	140	160	200
双蒸水 (μL)	200	160	120	100	80	60	40	0

操作步骤

样本处理:

① 用分析缓冲液重悬中性粒细胞（细胞密度至少为 1×10^6 个/mL），吸取0.9 mL细胞悬液于24孔板中，加入0.1 mL PMA工作液或A23187工作液诱导，37°C孵育4-6 h。（加入板孔前，需要对细胞进行计数，后续酶活计算使用，PMA诱导细胞死亡通过NOX途径，A23187诱导细胞死亡为非NOX途径）。

② 吸弃上清，用37°C预热的分析缓冲液清洗细胞两遍（每次加入1 mL， $300 \times g$ 离心5 min，弃上清）。

③ 加入0.5 mL试剂五工作液，37°C孵育30 min，取上清液至新EP管，加入0.01 mL试剂六，4°C $300 \times g$ 离心5 min，取上清至EP管，置于冰上待测（待测液体于4°C可保存一周）。

检测步骤:

① 标准孔：取 20 μL 不同浓度的标准品溶液加入到相应的酶标孔中。

测定孔：取 20 μL 待测样本，加入到相应的酶标孔中。

② 向步骤①中标各孔加入 100 μL 试剂七工作液。

③ 振板 5 s，37°C 孵育 30 min，使用酶标仪于 380 nm 检测各孔的 OD 值。

操作表

	标准孔	测定孔
不同浓度标准品溶液(μL)	20	--
待测样本(μL)	--	20
试剂七工作液(μL)	100	100
振板 5 s，37°C 孵育 30 min，使用酶标仪于 380 nm 检测各孔的 OD 值。		

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

细胞样本中中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)的酶活计算公式:

定义: 37°C 条件下, 每克细胞蛋白在反应体系中每分钟生成 1 μmol 产物
定义为一个酶活力单位。

$$\text{NE 活力} = (\Delta A - b) \div a \div n \div T \\ (\text{U}/10^6)$$

注解:

y: 标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

ΔA : 测定孔 OD 值-空白孔 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

n: 细胞加入板孔的个数, 10^6

T: 反应时间, 30 min

附录1 关键数据

1. 技术参数

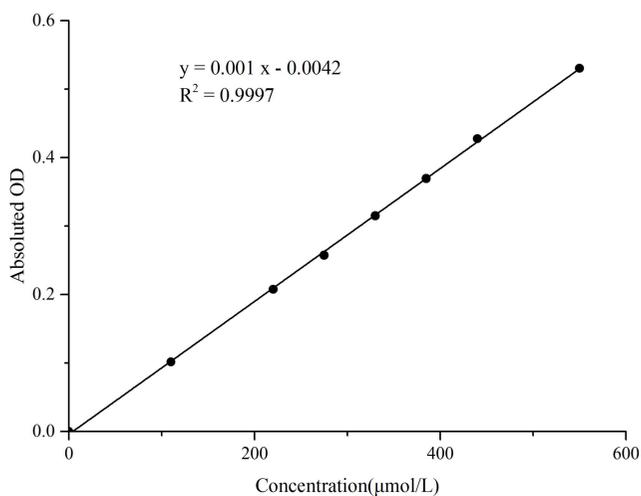
检测范围	0.31-18.33 U/L	批间差	4.8-7.4%
灵敏度	0.31 U/L	批内差	2.1-3.8%
稀释回收率	95-100%		

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:

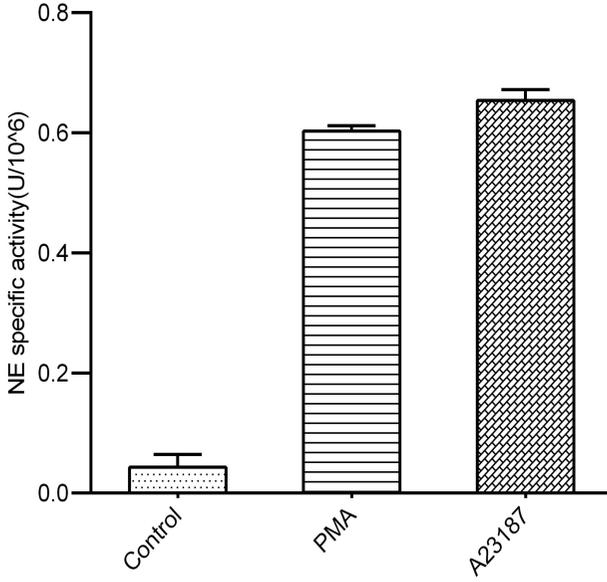
标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	110	220	275	330	385	440	550
OD 值	0.157	0.256	0.355	0.409	0.467	0.526	0.581	0.686
	0.157	0.261	0.374	0.420	0.477	0.527	0.588	0.689
平均 OD 值	0.157	0.259	0.365	0.415	0.472	0.527	0.585	0.688
绝对 OD 值	0	0.102	0.208	0.258	0.315	0.370	0.428	0.531

② 绘制标曲(如下图):



附录2 样本实例

1. PMA和A23187诱导中性粒细胞的NE酶活



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。

