# Human Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) ELISA Kit

Catalog No.: RK00276

version: 2.0

*使用产品前，请务必阅读产品包装内说明书

## 产品简介

本试剂盒产品使用夹心法定量测定人血清、血浆、细胞培养上清或其它生物体液中 eNOS 的含量。

## 产品检测原理

本实验采用双抗夹心 ELISA 法。 将抗 eNOS 抗体预先包被在酶标板上，向微孔中分别加入标准品和样品，样本中 eNOS 与固相载体上的抗体结合。孵育完成后，甩干板条中的液体并拍干，加入抗 eNOS 的检测抗体，形成双抗体夹心。洗去未结合的检测抗体，然后向微孔中加入酶结合物。孵育和洗涤后，加入底物 TMB。样品中 eNOS 的含量与 TMB 反应的颜色深浅呈正相关，加入酸终止反应并测量吸光值。根据梯度稀释的 eNOS 标准品的吸光值绘制标准曲线并求出样品的浓度。

## 试剂盒组分及保存条件

未拆封的试剂盒可在 2-8° C 保存 1 年，已拆封的产品须在 1 个月内使用完。

| 组分 | 规格 | 货号 | 拆封后保存条件 |
|---|---|---|---|
| 人 eNOS 预包被酶标板<br>Human eNOS Microwell Plate Coated | 8×12 | RM01132 | 将未使用的板条放回装有干燥剂的铝箔袋中，并重新密封，可在 2-8° C 存储 1 个月。 |
| 人 eNOS 冻干标准品<br>Human eNOS Standard Lyophilized | 2 支 | RM01129 | 复溶后不建议再次使用。 |
| 人 eNOS 浓缩生物素化抗体（100×）<br>Human eNOS Concentrated Biotin Conjugate Antibody (100×) | 1 ×120 μL | RM01130 | 可在 2-8° C 存储 1 个月。 |
| 浓缩链霉亲和素-HRP（100x）<br>Streptavidin-HRP Concentrated (100×) | 1 ×120 μL | RM01131 | 可在 2-8° C 存储 1 个月。 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 标准品/样本稀释液（R1）<br>Standard/Sample Diluent (R1) | 1 ×20 mL | RM00023 | 可在 2-8° C 存储 1 个月。 |
| 生物素化抗体稀释液（R2）<br>Biotin-Conjugate Antibody Diluent (R2) | 1 ×14 mL | RM00024 | |
| 链霉亲和素-HRP 稀释液（R3）<br>Streptavidin-HRP Diluent(R3) | 1 ×14 mL | RM00025 | |
| 浓缩洗涤液（25x）<br>Wash Buffer(25x) | 1 ×30 mL | RM00026 | |
| 显色底物<br>TMB Substrate | 1 ×10 mL | RM00027 | |
| 终止液<br>Stop Solution | 1 ×10 mL | RM00028 | |
| 封板膜<br>Plate Sealers | 4 张 | | |
| 说明书<br>Specification | 1 | | |

*特别提示：表中所列为 96T 规格试剂盒，48T 试剂盒中预包被酶标板、冻干标准品、浓缩生物素化抗体、浓缩链霉亲和素-HRP 组分减半，其他组分量均不变，请知悉。

## 实验所需的材料

1. 酶标仪，并配置主波长 450 nm，次波长 630 nm 或 570 nm。
2. 单/多通道移液器及吸头。
3. 去离子水或蒸馏水。
4. 洗瓶或是自动洗板机。
5. 恒温箱。
6. 灭菌的试管或是 EP 管，用于样本或是标准蛋白的稀释。

## 重要提示

*本产品仅用于科研，不能用于临床诊断。

1. 请留意产品标签上的有效期时间，并在有效期前使用本产品。
2. 请勿将不同批次或者来自不同厂家的试剂混合使用。
3. 如测试获得的样本 OD 值超过了产品的最高检测限，请使用产品中的标准品/样本稀释液（R1）对样本进行稀释。所以，在正式测试样本前，建议先进行样本的预测试。
4. 实验过程中的加样、洗板、孵育时间、孵育温度等操作均会对最终结果造成影响，请严格管理实验流程并做好记录。
5. 样本的收集、处理及保存均会对检测结果产生影响，请务必严格管理样本的处理过程。
6. 在本试验中对所有因素进行试验之前，不能排除干扰的可能性。
7. 相关试剂中可能存在有害物质，使用中请注意佩戴手套，必要时

佩戴护目镜。

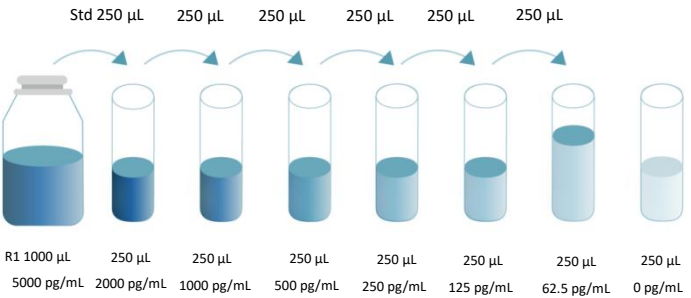
8. 终止液为腐蚀性液体，请做好相关防护。
9. 为保证最佳检测效果，相关试剂组分的保存请参照标签或是说明书。
10. 试剂配制后的混匀对检测结果非常重要，但部分蛋白或是抗体可能对剧烈的涡旋非常敏感，可能造成活性损失，请谨慎使用涡旋。
11. 请使用灭菌的耗材进行试剂配制，以免造成试剂污染，影响最终检测结果。
12. 为保证最佳检测效果，溶解后的标准蛋白及相关试剂的工作液不建议冻存后重复使用。
13. 产品在储存或是使用中，请注意避光。
14. 为保证最佳检测效果，在加不同样本时，请注意更换吸头。
15. 请严格按照说明书的要求进行试剂配制。如果您将分次使用试剂盒，请使用封口袋密封好预包被板，并且在开封后的 1 个月内使用完。
16. 48T 的试剂盒也同样可参考说明书进行实验。

## 样本收集与保存

1. 细胞培养上清：1000xg 离心 10 分钟，及时检测；或分装后-20℃至-70℃保存（24 小时内可置于 2-8℃），避免反复冻融。如果细胞培养上清样本的稀释度比较大，可先用培养基进行中间的稀释，最后用标准品/样本稀释液(R1)稀释。
2. 血清：使用血清分离管，分离血清前让样品凝结 30 分钟，1000 xg 离心 10 分钟并及时检测；或分装后-20℃至-70℃保存（24 小时内可置于 2-8℃），避免反复冻融。
3. 血浆：收集血浆时用 EDTA 或肝素作为抗凝剂，在 30 分钟内 1000 xg 离心 15 分钟收集样本，及时检测；或分装后-20℃至-70℃保存（24 小时内可置于 2-8℃），避免反复冻融。
4. 其它生物体液：1000×g 离心 20 分钟，取上清即可检测，或将上清置于-20℃ 或-80℃保存，避免反复冻融。
5. 避免使用溶血、高血脂血清/血浆样本。

## 试剂准备

1. 使用前将所需使用的试剂平衡至室温。如果浓缩液中有结晶析出，需要将试剂置于室温轻轻摇动，直至晶体完全溶解。
2. 标准品：向冻干品中加入 1 mL 的标准品/样本稀释液 R1，轻轻混匀至少 15 min，使冻干品完全溶解至浓度为 4000 pg/mL。按照下图准备好包含 R1 稀释液的 EP 管，并按照提示进行梯度稀释（建议标准曲线使用以下浓度：4000，2000，1000，500，250，125，62.5，0 pg/mL）。




3. 生物素化抗体工作液（1×）：在使用前用生物素化抗体稀释液（R2）将浓缩生物素化抗体以 1：99 的比例稀释成 1× 生物素化抗体工作液。即量取 1 份浓缩生物素化抗体，加入 99 份生物素化抗体稀释液（R2），充分混匀。注意：稀释后的工作液应在 30 分钟内使用。

4. 链霉亲和素-HRP 工作液（1×）：在使用前用链霉亲和素-HRP 稀释液（R3）将浓缩链霉亲和素-HRP 以 1：99 的比例稀释成 1× 链霉亲和素-HRP 工作液。即量取 1 份浓缩链霉亲和素-HRP，加入 99 份链霉亲和素-HRP 稀释液（R3），充分混匀。注意：稀释后的工作液应在 30 分钟内使用。
5. 洗涤液（1×）：使用前需用双蒸水或去离子水按体积比稀释成 1× 洗涤液（1:24 稀释）。即量取 1 份浓缩洗涤液，加入 24 份双蒸水或去离子水，充分混匀。注意：若浓缩液中析出结晶，将其回温至室温并轻柔混匀，直至结晶完全溶解。

## 样本准备

不同的样本需要根据具体情况选择合适的稀释倍数，稀释样本请使用试剂盒内的标准品/样本稀释液（R1）。

1. 细胞上清：由于细胞上清样本因实验条件不同，呈现较大的差异，故细胞上清样本建议进行预测试来决定合适的稀释倍数，样本稀释请使用标准品/样本稀释液（R1）或是 PBS。
2. 血清/血浆：由于存在个体差异，请提前预估样本的浓度范围，并通过预实确定待检样本的稀释倍数。

样本稀释请使用标准品/样本稀释液（R1）。

参考稀释方案如下：

稀释 100 倍：一步稀释。取 5 μL 样本到 495 μL 标准品/样本稀释液（R1）内，做 100 倍稀释；

稀释 1000 倍：两步稀释。取 5 μL 样本到 95 μL 标准品/样本稀释液（R1）内，做 20 倍稀释，再取 5 μL 20 倍稀释样本到 245 μL 标准品/样本稀释液（R1）内，做 50 倍稀释，总共稀释 1000 倍；每步稀释时取液量不少于 3 μL，稀释倍数不超过 100 倍。每步稀释都需混合均匀，避免起泡。

## 实验步骤

为获得理想的实验结果，请注意，所需使用的试剂在使用前平衡到室温。建议所有标准品、对照品和样品均做复孔测试。

1. 按照前几节的指示准备好所有试剂、工作标准品和样品。从板框上取下待用的微孔板条，将剩余的板条放回装有干燥剂的铝箔袋中，然后重新密封保存。
2. 在空白孔中添加 100 μL 标准品/样本稀释液（R1）。
3. 在其他孔中分别加入 100 μL 不同浓度的标准品或样品，用提供的封板膜封闭板孔，37℃孵育 90 分钟。
4. 在使用前 15 分钟配制好生物素化抗体（1×）工作液。
5. 弃去孔中液体，不用洗涤。每孔中加入生物素化抗体工作液（100 μL/孔），并盖上新的封板膜，37℃下孵育 60 分钟。
6. 弃去孔中液体，在洁净的吸水纸上拍干。每孔加入 1x 洗涤缓冲液 350 μL，静置 40 秒后弃去液体，该步骤共洗涤 3 次。
7. 使用前 15 分钟配制好链霉亲和素-HRP（1×）的工作液。
8. 每孔中加入链霉亲和素-HRP 工作液（100 μL/孔），并盖上新的封板膜，37℃孵育 30 分钟。
9. 在孵育期间，打开酶标仪预热 30 分钟后再进行测量。
10. 弃去孔中液体，洗板 5 次，方法同步骤 6。
11. 向孔中加入 TMB 底物（90 μL/孔）。 在 37℃下避光孵育 15-20 分钟。

12. 加入终止液（50 μL/孔），并立即放入酶标仪，在 5 分钟内测定每个孔 450 nm 的 OD 值。 如果可以选择校正波长，则设置为 570 nm 或 630 nm。 并从 450 nm 的读数中减去 570 nm 或 630 nm 的读数，这种方式可以校正并去除非显色物质的 OD 值，从而获得更准确的检测结果。如果无法选择校正波长，则获得的读数将偏高，导致读数的准确度下降。

## 简要实验流程

准备好需要的标准品和试剂

↓

向孔中加入 100 μL 标准品或待测样本

37℃孵育 90 分钟，弃去液体，甩干

↓

每孔加 100 μL 生物素化抗体工作液

37℃孵育 60 分钟，然后洗板 3 次

↓

每孔加 100 μL 链霉亲和素-HRP 工作液

37℃孵育 30 分钟，然后洗板 5 次

↓

加入 90 μL 底物溶液，37℃避光，孵育 15-20 分钟

↓

加入 50 μL 终止液

↓

5 分钟内检测 450 nm 波长的 OD 值

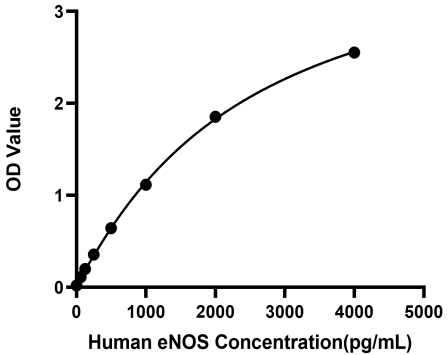
校正波长设置为 570 nm 或 630 nm

## 结果计算

1. 计算标准蛋白各浓度、质控、样本等复孔的平均 OD 值，每个测试的 OD 值都应减去空白孔的 OD 值以及次波长的 OD 值。
2. 使用测试获得的 OD 值绘制标准曲线，推荐使用 4-PL 拟合，具体也可根据需求选择其他拟合方式来绘制标准曲线。使用计算机软件以吸光度 OD 值为纵坐标（Y），相应的 eNOS 标准品浓度为横坐标（X），绘制标准曲线。样品的含量可根据其 OD 值由标准曲线计算出相应的浓度。
3. 如果样本在上样检测时进行了稀释，那么计算获得浓度需要乘以相应的稀释倍数。

## 典型数据

此标准曲线图仅供参考，计算实验结果请以实际实验数据进行。




## 检测范围

62.5-4000 pg/mL

## 灵敏度

最低检测 eNOS 可达 37.5 pg/mL。

重复测定空白样本 20 次，计算 20 次反应测得的均值（$\ddot{X}$）和标准差（SD），以$\ddot{X}$+2SD 计算出相应的浓度，即为分析灵敏度。

## 特异性

本试剂盒可用于检测重组/天然人 eNOS。

该方法对 eNOS 的检测具有较高的灵敏度和特异性。

eNOS 与类似物无明显交叉反应或干扰。

注意:

由于现有的技术和知识的限制，我们不可能完成 eNOS 与所有类似物之间的交叉反应检测，因此交叉反应可能仍然存在。

## 精密度

批内差

在同一块板上重复测试三个已知浓度的样品 20 次，计算浓度的变异系数（CV）。

批内 CV<10%。

批间差

用两批试剂盒对三个已知浓度的样品分别进行 20 次测试，计算浓度的变异系数（CV）。

批间 CV<15%。

| | 批内精密度 | | | 批间精密度 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 样本 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| 数量 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| 浓度(pg/mL) | 156.25 | 500 | 3000 | 156.25 | 500 | 3000 |
| 标准偏差（SD） | 5.89 | 19.95 | 149.4 | 9.33 | 32.35 | 183.3 |
| 变异系数 CV(%) | 3.77 | 3.99 | 4.98 | 5.97 | 6.47 | 6.11 |

## 回收率

将高、中、低 3 个不同浓度的 eNOS 蛋白加入到对应的样本中检测，并计算蛋白的回收率（实际测试的样本浓度/理论样本浓度 x100%）。

| 样本类型 | 平均回收率（%） | 范围（%） |
|---|---|---|
| 细胞上清(n=5) | 93 | 83-101 |
| 血清(n=5) | 91 | 88-103 |

## 线性

将高浓度 eNOS 加入样本中，在标准曲线范围内稀释并计算线性。

| / | / | 细胞上清(n=5) | 血清(n=5) |
|---|---|---|---|
| 1:2 | 平均符合率（%） | 94 | 106 |
| | 范围（%） | 82-106 | 94-116 |
| 1:4 | 平均符合率（%） | 98 | 95 |
| | 范围（%） | 85-107 | 89-109 |
| 1:8 | 平均符合率（%） | 87 | 91 |
| | 范围（%） | 84-102 | 88-115 |
| 1:16 | 平均符合率（%） | 87 | 111 |
| | 范围（%） | 82-115 | 94-116 |

# ELISA 常见问题分析及解决方法

| 问题描述 | 可能原因 | 解决方法 |
|---|---|---|
| 高背景值 | 洗板不充分 | 按要求充分洗涤，保证洗板时间、次数及每孔加样量无误 |
| | 孵育条件不正确 | 检查孵育时间、温度是否按要求进行 |
| | 试剂、样本的交叉污染 | 注意实验过程中可能造成样本交叉污染的操作；配制新鲜的试剂，重复测试 |
| 无信号值或过低的信号值 | 试剂配制和使用错误 | 检查试剂配制浓度是否正确，是否按照顺序使用 |
| | 酶标仪使用、设置不正确 | 提前预热；设置正确的主、次波长读数 |
| | 显色时间过短 | 最佳显色时间应控制在 15-25 min |
| | 终止后，未及时读数 | 加入终止液后，在 5 min 内读数 |
| | 样本基质效应 | 使用阳性质控品对照测试 |
| 过强的信号值 | TMB 底物变质 | 检查 TMB 底物是否变蓝，使用新的底物试剂 |
| | | 避免使用金属物质接触底物造成变质失效 |
| | 每步实验未更换新的封板膜 | 每步实验更换新的封板膜 |
| | 样本中目标蛋白量过高 | 预测试，选择适当稀释倍数测试 |

| | | |
|---|---|---|
| 重复性差 | 加样量不均一 | 检查移液器，定期校准 |
| | 样本有杂质或沉淀物 | 样本使用前，请离心样本 |
| | 试剂配制未充分混匀 | 加样前充分混匀试剂 |

*仅供科研使用，不可用于治疗或诊断目的。