

大鼠一氧化氮合成酶(T-NOS、iNOS、cNOS)酶联免疫分析 (ELISA)

试剂盒使用说明书

本试剂仅供研究使用 目的：本试剂盒用于测定大鼠血清，血浆及相关液体样本中一氧化氮合成酶(T-NOS、iNOS、cNOS)的含量。

实验原理：

本试剂盒应用双抗体夹心法测定标本中大鼠一氧化氮合成酶(T-NOS、iNOS、cNOS)水平。用纯化的大鼠一氧化氮合成酶(T-NOS、iNOS、cNOS)抗体包被微孔板，制成固相抗体，往包被单抗的微孔中依次加入一氧化氮合成酶(T-NOS、iNOS、cNOS)，再与 HRP 标记的一氧化氮合成酶(T-NOS、iNOS、cNOS)抗体结合，形成抗体-抗原-酶标抗体复合物，经过彻底洗涤后加底物 TMB 显色。TMB 在 HRP 酶的催化下转化成蓝色，并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的一氧化氮合成酶(T-NOS、iNOS、cNOS)呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度 (OD 值)，通过标准曲线计算样品中大鼠一氧化氮合成酶(T-NOS、iNOS、cNOS)浓度。

试剂盒组成：

试剂盒组成	48 孔配置	96 孔配置	保存
说明书	1 份	1 份	
封板膜	2 片 (48)	2 片 (96)	
密封袋	1 个	1 个	
酶标包被板	1×48	1×96	2-8℃保存
标准品：90μmol/L	0.5ml×1 瓶	0.5ml×1 瓶	2-8℃保存
标准品稀释液	1.5ml×1 瓶	1.5ml×1 瓶	2-8℃保存
酶标试剂	3 ml×1 瓶	6 ml×1 瓶	2-8℃保存
样品稀释液	3 ml×1 瓶	6 ml×1 瓶	2-8℃保存
显色剂 A 液	3 ml×1 瓶	6 ml×1 瓶	2-8℃保存
显色剂 B 液	3 ml×1 瓶	6 ml×1 瓶	2-8℃保存
终止液	3ml×1 瓶	6ml×1 瓶	2-8℃保存
浓缩洗涤液	(20ml×20 倍) ×1 瓶	(20ml×30 倍) ×1 瓶	2-8℃保存

样本处理及要求:

1. 血清: 室温血液自然凝固 10-20 分钟, 离心 20 分钟左右 (2000-3000 转/分)。仔细收集上清, 保存过程中如出现沉淀, 应再次离心。
2. 血浆: 应根据标本的要求选择 EDTA 或柠檬酸钠作为抗凝剂, 混合 10-20 分钟后, 离心 20 分钟左右 (2000-3000 转/分)。仔细收集上清, 保存过程中如有沉淀形成, 应该再次离心。
3. 尿液: 用无菌管收集, 离心 20 分钟左右 (2000-3000 转/分)。仔细收集上清, 保存过程中如有沉淀形成, 应再次离心。胸腹水、脑脊液参照实行。
4. 细胞培养上清: 检测分泌性的成份时, 用无菌管收集。离心 20 分钟左右 (2000-3000 转/分)。仔细收集上清。检测细胞内的成份时, 用 PBS (PH7.2-7.4) 稀释细胞悬液, 细胞浓度达到 100 万/ml 左右。通过反复冻融, 以使细胞破坏并放出细胞内成份。离心 20 分钟左右 (2000-3000 转/分)。仔细收集上清。保存过程中如有沉淀形成, 应再次离心。
5. 组织标本: 切割标本后, 称取重量。加入一定量的 PBS, PH7.4。用液氮迅速冷冻保存备用。标本融化后仍然保持 2-8℃ 的温度。加入一定量的 PBS (PH7.4), 用手工或匀浆器将标本匀浆充分。离心 20 分钟左右 (2000-3000 转/分)。仔细收集上清。分装后一份待检测, 其余冷冻备用。
6. 标本采集后尽早进行提取, 提取按相关文献进行, 提取后应尽快进行实验。若不能马上进行试验, 可将标本放于 -20℃ 保存, 但应避免反复冻融。
7. 不能检测含 NaN₃ 的样品, 因 NaN₃ 抑制辣根过氧化物酶的 (HRP) 活性。

操作步骤

1. 标准品的稀释与加样: 在酶标包被板上设标准品孔 10 孔, 在第一、第二孔中分别加标准品 100μl, 然后在第一、第二孔中加标准品稀释液 50μl, 混匀; 然后从第一孔、第二孔中各取 100μl 分别加到第三孔和第四孔, 再在第三、第四孔分别加标准品稀释液 50μl, 混匀; 然后在第三孔和第四孔中先各取 50μl 弃掉, 再各取 50μl 分别加到第五、第六孔中, 再在第五、第六孔中分别加标准品稀释液 50μl, 混匀; 混匀后从第五、第六孔中各取 50μl 分别加到第七、第八孔中, 再在第七、第八孔中分别加标准品稀释液 50μl, 混匀后从第七、第八孔中分别取 50μl 加到第九、第十孔中, 再在第九第十孔分别加标准品稀释液 50μl, 混匀后

从第九第十孔中各取 50 μ l 弃掉。(稀释后各孔加样量都为 50 μ l, 浓度分别为 60 μ mol/L, 40 μ mol/L, 20 μ mol/L, 10 μ mol/L, 5 μ mol/L)。

2. 加样: 分别设空白孔(空白对照孔不加样品及酶标试剂, 其余各步操作相同)、待测样品孔。在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液 40 μ l, 然后再加待测样品 10 μ l(样品最终稀释度为 5 倍)。加样将样品加于酶标板孔底部, 尽量不触及孔壁, 轻轻晃动混匀。

3. 温育: 用封板膜封板后置 37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟。

4. 配液: 将 30(48T 的 20 倍)倍浓缩洗涤液用蒸馏水 30(48T 的 20 倍)倍稀释后备用。

5. 洗涤: 小心揭掉封板膜, 弃去液体, 甩干, 每孔加满洗涤液, 静置 30 秒后弃去, 如此重复 5 次, 拍干。

6. 加酶: 每孔加入酶标试剂 50 μ l, 空白孔除外。

7. 温育: 操作同 3。

8. 洗涤: 操作同 5。

9. 显色: 每孔先加入显色剂 A50 μ l, 再加入显色剂 B50 μ l, 轻轻震荡混匀, 37 $^{\circ}$ C 避光显色 15 分钟。

10. 终止: 每孔加终止液 50 μ l, 终止反应(此时蓝色立转黄色)。

11. 测定: 以空白空调零, 450nm 波长依序测量各孔的吸光度(OD 值)。测定应在加终止液后 15 分钟以内进行。

注意事项:

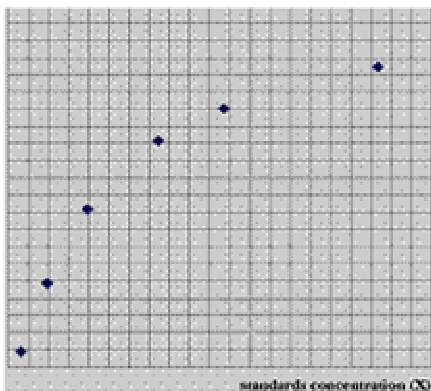
1. 试剂盒从冷藏环境中取出应在室温平衡 15-30 分钟后方可使用, 酶标包被板开封后如未用完, 板条应装入密封袋中保存。

2. 浓洗涤液可能会有结晶析出, 稀释时可在水浴中加温助溶, 洗涤时不影响结果。

3. 各步加样均应使用加样器, 并经常校对其准确性, 以避免试验误差。一次加样时间最好控制在 5 分钟内, 如标本数量多, 推荐使用排枪加样。

4. 请每次测定的同时做标准曲线, 最好做复孔。如标本中待测物质含量过高(样本 OD 值大于标准品孔第一孔的 OD 值), 请先用样品稀释液稀释一定倍数(n 倍)后再测定, 计算时请最后乘以总稀释倍数($\times n \times 5$)。

5. 封板膜只限一次性使用，以避免交叉污染。
6. 底物请避光保存。
7. 严格按照说明书的操作进行，试验结果判定必须以酶标仪读数为准。
8. 所有样品，洗涤液和各种废弃物都应按传染物处理。
9. 本试剂不同批号组分不得混用。
10. 如与英文说明书有异，以英文说明书为准。



计算：

以标准物的浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，在坐标纸上绘出标准曲线，根据样品的 OD 值由标准曲线查出相应的浓度；再乘以稀释倍数；或用标准物的浓度与 OD 值计算出标准曲线的直线回归方程式，将样品的 OD 值代入方程式，计算出样品浓度，再乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。

（此图仅供参考）

试剂盒性能：

1. 样品线性回归与预期浓度相关系数 R 值为 0.95 以上。
2. 批内与批间应分别小于 9% 和 11%

保存条件及有效期：

1. 试剂盒保存：； 2-8℃。
2. 有效期： 6 个月

Shanghai Yueyan Biological Technology Co.,Ltd

Address:Room1104,No.9Building,Ning Guo Road No313,YangPu
District,Shanghai,China.

Tel:+86-021-55785280 55785281

Fax:+86-021-55785279

E-mail:biolzy@yahoo.cn