小鼠诱导型 NO 合酶(iNOS)
酶联免疫吸附测定试剂盒

本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断

使

用

说

明

书

- **货号**：JL20675
- **检测范围**：7.8-500IU/mL
- **规格**：96T/48T
- **保存温度**：2-8℃
- **种属**：小鼠
- **有 效 期**：6 个月

iNOS 简介：

诱导型 NO 合酶(iNOS)是由氨基酸 l-arginine 生成一氧化氮（NO）的三种关键酶之一。INOS 衍生的 NO 在许多生理（如血压调节、伤口修复和宿主防御机制）和病理生理（炎症、感染、肿瘤性疾病、肝硬化、糖尿病）条件下发挥着重要作用。然而，INOS 在肿瘤发展过程中的作用是非常复杂的，如蜕变、血管生成和转移，是由 INOS 调节的。另一方面，来自巨噬细胞的 NO 对肿瘤细胞有潜在的细胞毒性/细胞抑制作用。因此，对 INOS 活动的治疗干预具有相当大的意义，特别是在肿瘤中，转移活动、宿主防御机制和分化水平与 INOS 的表达相关。

实验原理：

本试剂盒采用双抗体夹心法酶联免疫吸附试验（ELISA）。往预先包被有小鼠诱导型 NO 合酶(iNOS)捕获抗体的微孔中，依次加入样本、标准品、生物素标记的检测抗体，HRP 酶结合物，中间经过温育和洗涤，用底物 TMB 显色，TMB 在过氧化物酶(HRP)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小鼠诱导型 NO 合酶(iNOS)呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度（OD 值），计算样品浓度。

灵敏度：3.8IU/mL

特异性：可检测样本中小鼠的 iNOS，且与其类似物无明显交叉反应。

注意事项：

1. 严格按照规定的时间和温度进行温育以保证准确结果。所有试剂都必须在使用前达到室温 20-25℃。使用后立即冷藏保存试剂。
2. 洗板不正确可能导致不准确的结果。在加入底物前确保尽量吸干孔内液体。温育过程中不要让微孔干燥掉。
3. 消除板底残留的液体和手指印，否则影响 OD 值。
4. 底物显色液应呈无色或很浅的颜色，已经变蓝的底物液不能使用。
5. 避免试剂和标本的交叉污染以免造成错误结果。
6. 在储存和温育时避免强光直接照射。
7. 任何反应试剂不能接触漂白溶剂或漂白溶剂所散发的强烈气体。任何漂白成分都会破坏试剂盒中反应试剂的生物活性。
8. 不能使用过期产品，不同货号和批号组分不得混用。
9. 试剂盒以外来源的重组蛋白可能会出现与本试剂盒抗体不匹配而不被识别的情况。
10. 如果可能传播疾病，所有的样品都应管理好，按照规定的程序处理样品和检测装置。

实验所需自备试验器材：

1. 酶标仪（450nm）
2. 高精度加样器及枪头：0.5-10uL、5-50uL、20-200uL、200-1000uL
3. 37℃恒温箱
4. 蒸馏水或去离子水

试剂盒组成：

名称	96 孔配置	48 孔配置	备注
预包被 96 孔酶标板 Pre-coated Assay Plate	8 孔×12 条	8 孔×6 条	无
标准品 Standard	2 支	1 支	按说明书进行稀释
通用稀释液 Universal Diluent	2x20mL	1x20mL	无
浓缩生物素化检抗 100× Biotin-antibody (100×)	120μL	60μL	按说明书进行稀释
浓缩酶结合物 100× Streptavidin-HRP (100×)	120μL	60μL	按说明书进行稀释
20×洗涤液 Wash Buffer (20×)	2x10mL	1x10mL	按说明书进行稀释
底物（TMB） TMB Substrate	10mL	5mL	无
终止液 Stop Solution	6mL	3mL	无
封板膜 Plate Sealer	4 张	4 张	无
说明书 Instruction Manual	1 份	1 份	无

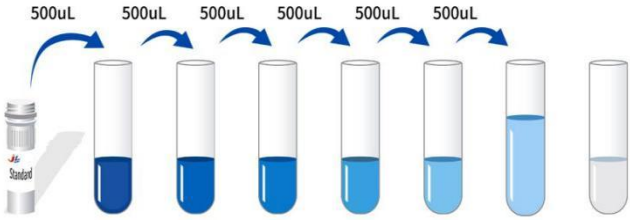
样本处理及要求：

1. **血清：**将收集于血清分离管的全血标本在室温放置 2 小时或 4℃过夜，然后 1000×g 离心 20 分钟，取上清即可，或将上清置于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。
2. **血浆：**用 EDTA 或肝素作为抗凝剂采集标本，并将标本在采集后的 30 分钟内于 2-8℃1000×g 离心 15 分钟，取上清即可检测，或将上清置于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。
3. **组织匀浆：**用预冷的 PBS (0.01M, pH=7.4)冲洗组织，去除残留血液（匀浆中裂解的红细胞会影响测量结果），称重后将组织剪碎。将剪碎的组织与对应体积的 PBS（一般按 1:9 的重量体积比，比如 1g 的组织样品对应 9mL 的 PBS，具体体积可根据实验需要适当调整，并做好记录。推荐在 PBS 中加入蛋白酶抑制剂）加入玻璃匀浆器中，于冰上充分研磨。为了进一步裂解组织细胞，可以对匀浆液进行超声破碎，或反复冻融。最后将匀浆液于 5000×g 离心 5~10 分钟，取上清检测。
4. **细胞培养物上清：**请 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，但应避免反复冻融。
5. **其它生物标本：**1000×g 离心 20 分钟，取上清即可检测。
6. **样品外观：**样品应清澈透明，悬浮物应离心去除。
7. **样品保存：**样品收集后若在 1 周内进行检测的可保存于 4℃，若不能及时检测，请按一次使用量分装，冻存于-20℃（1 个月内检测），或-80℃（6 个月内检测），避免反复冻融，标本溶血会影响最后检测结果，因此溶血标本不宜进行此项检测。

检测前准备工作：

1. 请提前 10 分钟从冰箱中取出试剂盒，平衡至室温。
2. **标准品梯度工作液配制**：加入 1mL 通用稀释液至冻干标准品中，静置 15 分钟待其完全溶解后轻轻混匀(浓度为 500IU/mL)，然后按照以下浓度：500IU/mL、250IU/mL、125IU/mL、62.5IU/mL、31.25IU/mL、15.62IU/mL、7.8IU/mL、0IU/mL 进行稀释。

   倍比稀释方法:取 7 支 EP 管,每管中加入 500μL 通用稀释液,500IU/mL 的标准品工作液中吸取 500μL 到第一支 EP 管中混匀配成 250IU/mL 的标准品工作液，按此步骤往后依次吸取混匀。最后一管直接作为空白孔，不需要再从倒数第二管中吸取液体，具体如下图。



IU/mL	500	250	125	62.5	31.25	15.62	7.8	0

3. **生物素化检抗工作液配制**:使用前 15 分钟将浓缩生物素化抗体于 1000×g 离心 1 分钟，以通用稀释液将 100×浓缩生物素化抗体稀释成 1×工作浓度(例：10μL 浓缩液+990μL 通用稀释液)，当日使用。
4. **酶结合物工作液配制**：使用前 15 分钟将 100x 浓缩酶结合物于 1000×g 离心 1 分钟，以通用稀释液将 100×浓缩 HRP 酶结合物稀释成 1×工作浓度(例：10μL 浓缩液+990μL 通用稀释液)，当日使用。
5. **1×洗涤液配制**：取 10ml 20×洗涤液到 190ml 蒸馏水中（从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶，属于正常现象，可放置室温，轻摇均匀，待结晶完全溶解后再配置)。

操作步骤：

1. 从室温平衡 10 分钟后的铝箔袋中取出所需板条，剩余板条用自封袋密封放回 4℃。

⇓

2. 加样：分别将样品或不同浓度标准品按照 100μl 每孔加入相应孔中，空白孔加入 100μL 通用稀释液。盖上封板膜后 37℃温育 1 小时。（建议：将待测样本用通用稀释液最低稀释 1 倍后再加入酶标板内测试，从而减少基质效应对测试结果的误差影响，最后计算样本浓度时需乘以对应的稀释倍数。所有的待测样本和标准品在检测中建议设立复孔）。

⇓

3. 加生物素化抗体：取出酶标板，弃去液体，不用洗涤。每孔直接加入生物素化抗体工作液 100μL，盖上封板膜后 37℃温育 1 小时。

⇓

4. 洗板：弃去液体，每孔加入 300μL 1x 洗涤液，静置 1 分钟，甩去洗涤液，吸水纸上拍干，如此重复洗板 3 次（也可用洗板机洗板）。

⇓

5. 加酶结合物工作液：每孔加入酶结合物工作液 100μL，盖上封板膜后 37℃温育 30 分钟。

⇓

6. 洗板：弃去液体按步骤 4 洗涤方法，洗板 5 次。

⇓

7. 加底物：每孔加入底物(TMB)90μL，盖上封板膜，37℃避光温育 15 分钟。

⇓

8. 加终止液：取出酶标板，每孔直接加入终止液 50μL，立即在 450nm 波长处测定各孔的 OD 值。

实验结果计算：

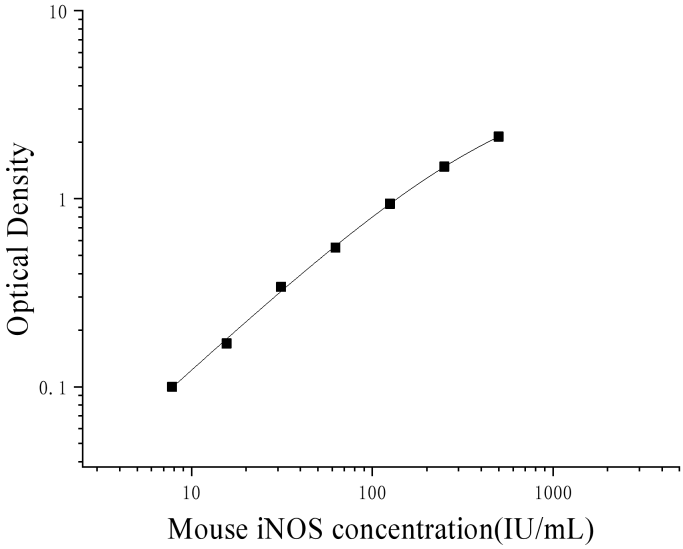
结果判断：

1. 计算标准品和样本复孔的平均 OD 值并减去空白孔的 OD 值作为校正值。以浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，在双对数坐标纸上绘出四参数逻辑函数的标准曲线(作图时去掉空白组的值)。
2. 若样品 OD 值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测并在计算样本浓度时乘以相应的稀释倍数。

典型数据和参考曲线：

以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线。

浓度（IU/mL）	500	250	125	62.5	31.25	15.62	7.8	0
OD 值	2.22	1.56	0.92	0.63	0.42	0.25	0.18	0.08
校正 OD 值	2.14	1.48	0.94	0.55	0.34	0.17	0.1	-



注意：本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线计算标本含量。

试剂盒性能：

1. 重复性：板内变异系数小于 10%，板间变异系数小于 10%。
2. 回收率：在选取的健康小鼠组织匀浆和细胞培养上清中加入 3 个不同浓度水平的小鼠 iNOS，计算回收率

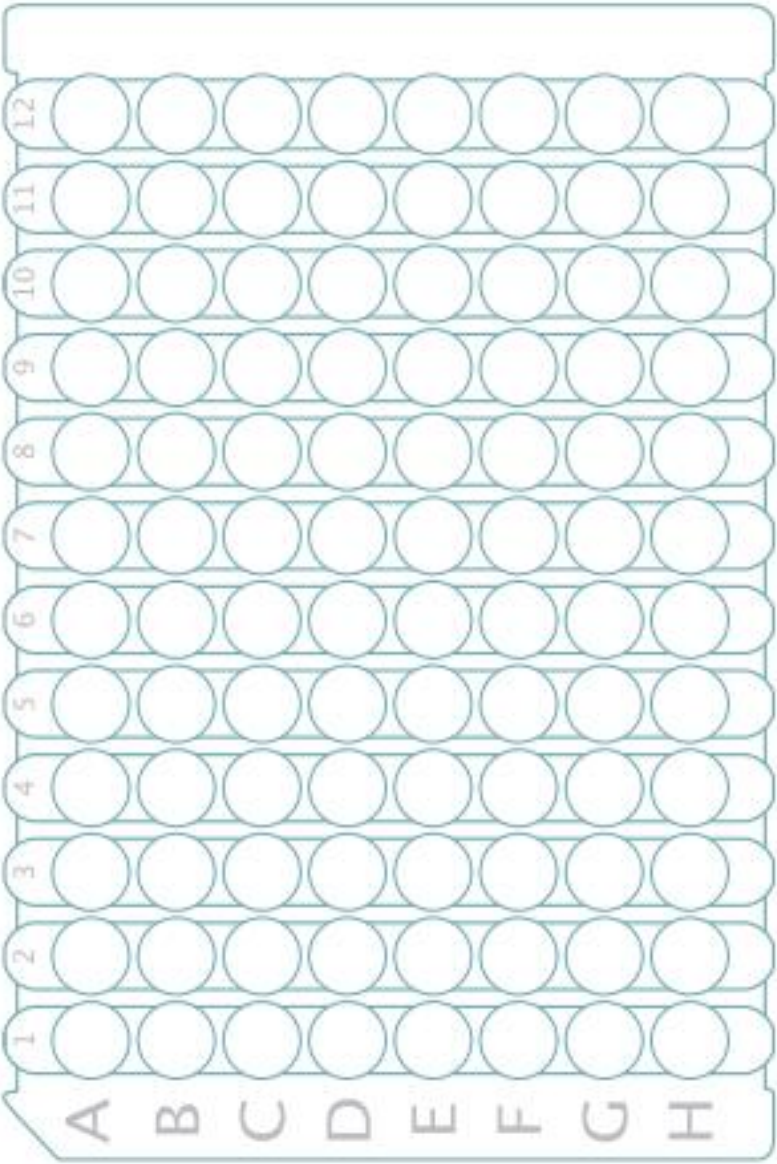
样本类型	范围	平均回收率
组织匀浆（n=8)	84-103	98
细胞培养上清(n=8)	96-108	105

3. 线性稀释：分别在选取的 4 份健康小鼠组织匀浆和细胞培养上清中加入高浓度小鼠 iNOS，在标准曲线动力学范围内进行稀释，评估线性。

稀释比例	回收率（%）	组织匀浆	细胞培养上清
1：2	范围（%）	84-95	90-110
	平均回收率（%）	91	96
1：4	范围（%）	89-105	105-115
	平均回收率（%）	95	108

参考文献:

1. Liu Y, Feng Q (July 2012). Differentiation. 84(1): 54–61.
2. Burger DE, Lu X, Lei M, Xiang FL, Hammoud L, Jiang M, Wang H, Jones DL, Sims SM, Feng Q (October 2009). Circulation. 120 (14): 1345–54.
3. Gusarov I, Starodubtseva M, Wang ZQ, McQuade L, Lippard SJ, Stuehr DJ, Nudler E (May 2008). J. Biol. Chem. 283 (19): 13140–7.
4. Förstermann,Ulrich;Sessa,William(Apr 2012).European Heart Journal. 33 (7): 829–837.
5. Kuncewicz T, Balakrishnan P, Snuggs MB, Kone BC (August 2001). Am. J. Physiol. Renal Physiol. 281 (2): F326–36.


12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
A
B
C
D
E
F
G
H

咨询电话： 400-0066-400

传　　真： 021-55660885

电子邮箱： shjlsw@163.com

网　　址： www.jonln.com