

人ENO2双抗夹心ELISA检测试剂盒

请在实验前仔细阅读本说明书

产品货号: KE00050
规格: 96T
灵敏度: 0.11 ng/mL
检测范围: 0.313 - 20 ng/mL
用途: 此试剂盒用于定量检测血清、血浆以及细胞上清以中人ENO2浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

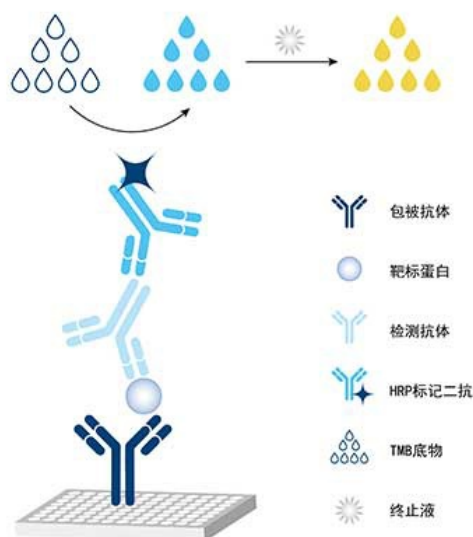
目录

一：背景信息	3
二：检测原理	3
三：需自备的实验器材	3
四：试剂盒组分及存储	4
五：实验注意事项	4
六：样本准备	4
七：试剂准备	5
八：实验步骤	6
九：实验参数	7
9.1 参考标曲图	7
9.2 精密度	7
9.3 加标回收率	8
9.4 样本值	8
9.5 灵敏度	8
9.6 线性	8
十：参考文献	8

一：背景信息

ENO2又称Enolases，是可能参与细胞分化的细胞质糖酵解酶。ENO2有三个同工酶，alpha，beta和gamma。 α 型在大多数组织中表达，而 β 型在肌肉组织中表达。 γ 型烯醇化酶（ENO2），特别是同源二聚体神经元特异性烯醇化酶（NSE），主要定位于神经元和神经内分泌细胞，是脑肿瘤的一种癌症诊断标志物。ENO2在糖酵解相关的能量途径中发挥作用，与白天的代谢活动比夜晚更高可能有一定联系。

二：检测原理



◀双抗夹心模式图 (检测抗体不标记)

按操作顺序形成抗体夹心结构后，加入TMB底物，板孔液体由无色变成蓝色，再加入终止液液体变为黄色后进行吸光度值测定。

三：需自备的实验器材

- 3.1 酶标仪 (可读取450 nm和630 nm双波长);
- 3.2 高精度移液器及一次性移液器枪头;
- 3.3 超纯水或去离子水;
- 3.4 洗板机 (亦可手动洗板);
- 3.5 EP管 (用于稀释标准品及样本);
- 3.6 吸水毛巾或滤纸 (用于拍干);
- 3.7 烧杯和量筒;
- 3.8 100 mM PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride) 存储液 (1 g PMSF溶于57 mL异丙醇)，样本需要裂解才用;
- 3.9 用于ELISA实验的数据分析的统计拟合软件 (推荐四参数拟合方法)，如：Origin，ELISA Calc等。

四：试剂盒组分及储存

英文名称	中文名称	规格	数量
Microplate	预包被酶标板 - 96孔板	8孔 × 12条	1 块
Protein standard	标准品 - 冻干粉状 *	40 ng/瓶	2 瓶
Detection antibody (100×)	检测抗体浓缩液 (100×) **	120 μL/支	1 支
HRP-conjugated antibody (100×)	HRP标记二抗浓缩液 (100×) **	120 μL/支	1 支
Sample Diluent PT 1-ag	样本稀释液 PT 1-ag (用于人血清, 血浆样本)	30 mL/瓶	1 瓶
Sample Diluent PT 1-af	样本稀释液 PT 1-af (用于细胞上清样本)	30 mL/瓶	1 瓶
Detection Diluent	抗体稀释液	30 mL/瓶	1 瓶
Wash Buffer Concentrate (20×)	浓缩洗涤液 (20×)	30 mL/瓶	1 瓶
TMB	显色底物 TMB	12 mL/瓶	1 瓶
Stop Solution	终止液	12 mL/瓶	1 瓶
Plate Cover Seals	封板膜		3 张
储存条件： 1：未开启试剂盒可在2-8℃条件下存放6个月或者在-20℃条件下存放1年 2：已开启试剂盒可在2-8℃存放7天 3：每次实验均使用新的标准品,使用后丢弃			

* 使用对应的样本稀释液对标准品进行复溶, 复溶过程避免产生气泡

** 开盖前请离心

五：实验注意事项

- 5.1 避免皮肤接触终止液以及TMB显色液;
- 5.2 在实验过程中, 注意穿戴个人防护装备, 如实验服, 手套, 口罩和护目镜;
- 5.3 请勿将不同批次的试剂进行混用, 过期产品请勿使用;
- 5.4 在使用自动洗板机时, 板孔加入洗涤液之后, 设置30秒的浸泡程序, 以提高分析的精确度。

六：样本准备

- 6.1 血清: 全血标本室温凝固 30 min后1000×g 离心15 min, 取上清立即使用或分装后-20℃存放, 避免反复冻融。
- 6.2 血浆: 可用EDTA或肝素作为抗凝剂, 标本采集后1000×g 离心15 min, 立即使用或分装后-20℃存放, 避免反复冻融(注意: 标本溶血会影响检测结果, 因此溶血标本不宜进行检测)。
- 6.3 细胞上清: 收集细胞培养液, 500×g 离心5 min取上清, 立即使用或分装后-20℃存放, 避免反复冻融。

七：试剂准备

7.1 洗涤液 (1×)：

如果洗涤液 (20×) 有晶体析出，37°C加热至晶体全部溶解。按1:20稀释倍数进行稀释：如取30 mL 浓缩洗涤液 (20×)，加入570 mL 超纯水或去离子水，得到洗涤液 (1×)。

7.2 检测抗体 (1×)：

开盖前瞬时离心，按1:100比例进行稀释，稀释前根据预先计算实验所需的总量配制 (100 μL/孔)，实际配制时应多配制0.1-0.2 mL。如10 μL 检测抗体浓缩液 (100×) 加 990μL 抗体稀释液进行配制，轻轻混匀。

7.3 HRP标记二抗 (1×)：

开盖前瞬时离心，按1:100比例进行稀释，稀释前根据预先计算实验所需的总量配制 (100 μL/孔)，实际配制时应多配制0.1-0.2 mL。如10 μL HRP标记的链霉亲和素浓缩液 (100×) 加 990μL 抗体稀释液进行配制，轻轻混匀。

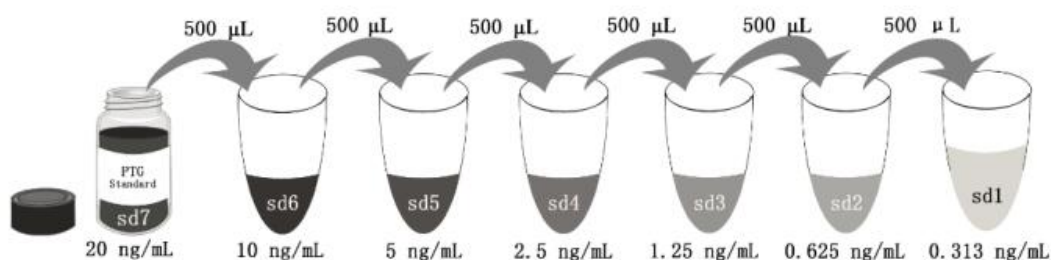
7.4 待检测样本：

不同的样本使用相应的样本稀释液进行稀释，如果样本检测值超过标曲最高范围，可将样本进行一定的稀释后再进行实验，使样本的检测值处于标曲范围内，不同样本的稀释倍数需自行优化。

稀释比推荐如下：人血清、血浆1:4稀释；样品采集、处理和储存的差异可能导致测值的改变。

7.5 梯度稀释的标准品：

检测人血清、血浆样本，使用2mL PT 1-ag 样本稀释液复溶标准品；检测细胞上清样本，使用2mL PT 1-af 样本稀释液复溶标准品，具体操作如下：



Add # μL of Standard diluted in the previous step	—	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL
# μL of Sample Diluent PT 1-ag or PT1-af	2000 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL
	"sd7"	"sd6"	"sd5"	"sd4"	"sd3"	"sd2"	"sd1"

八：实验步骤

实验前,需要将所需试剂在室温平衡20-30 min(检测抗体浓缩液、HRP标记二抗浓缩液不需要平衡室温,即用即取);在进行标准品、样本以及不同试剂加样时,更换枪头,避免接触微孔板的内表面,不同的试剂,使用不同的加样槽。

8.1 根据实验用量,取出需要用到的酶标板条,剩余板条加入干燥剂放入铝箔袋密封后存放于4°C,并于一周之内用完;

8.2 加样,分别设零孔、标准孔、待测样本孔。零孔加样本稀释液100 μL,余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本100 μL/孔,注意不要产生气泡(建议标准品和样本都做复孔,尽量避免实验误差,确保上样不间断,5-10 min完成加样);

8.3 酶标板上覆盖膜,37°C孵育1 h;

8.4 洗涤

1) 揭开封板膜(动作轻柔,避免动作过大导致液体溢出串孔),弃液体,拍干;

2) 洗涤液(1x)洗涤板条,每孔350-400 μL,洗涤后,甩掉液体拍干板条,重复此步骤4次,避免异物进入板孔以及板条干燥;

8.5 每孔加100 μL 检测抗体(1x)(参照试剂准备部分7.2),盖上封板膜,37°C孵育1 h;

8.6 重复步骤8.4;

8.7 每孔加100 μL HRP标记二抗(1x)(参照试剂准备部分7.3),盖上封板膜,37°C孵育40 min;

8.8 重复步骤8.4;

8.9 显色:每孔加TMB显色液100 μL,37°C避光显色15-20 min(如果颜色偏浅,可适当延长显色时间,不超过30 min;保持显色底物始终处于避光状态,显色底物在加样前应是无色透明,如有变色,请勿使用);

8.10 终止:每孔加终止液100 μL,蓝色变黄色。终止液与TMB显色液的加样顺序一致;(注意:眼睛和皮肤避免接触终止液);

8.11 读数:以630 nm为校正波长,用酶标仪在450 nm波长测量各孔的光密度(OD值)。加入终止液后5 min内进行读数,若无630 nm 波长,也可直接使用450 nm 波长读数;

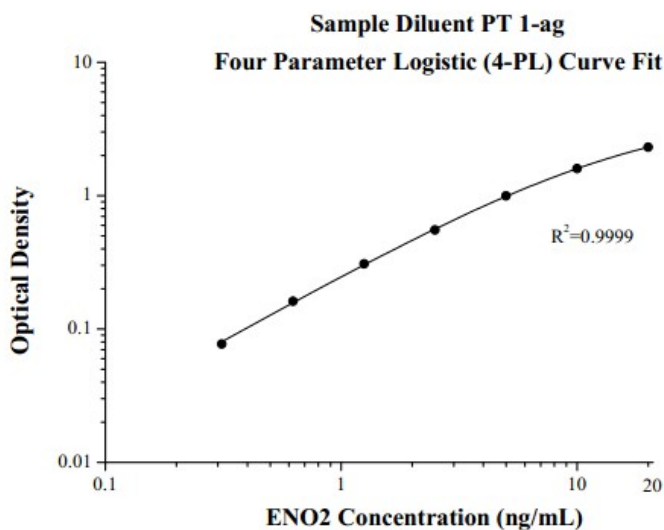
8.12 数据分析:每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值,设置复孔,取其平均值。以标准品的浓度为横坐标,OD 值为纵坐标,使用专业软件(如Origin、ELISACalc等)进行四参数拟合(4-PL),根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度,乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

操作流程如下:

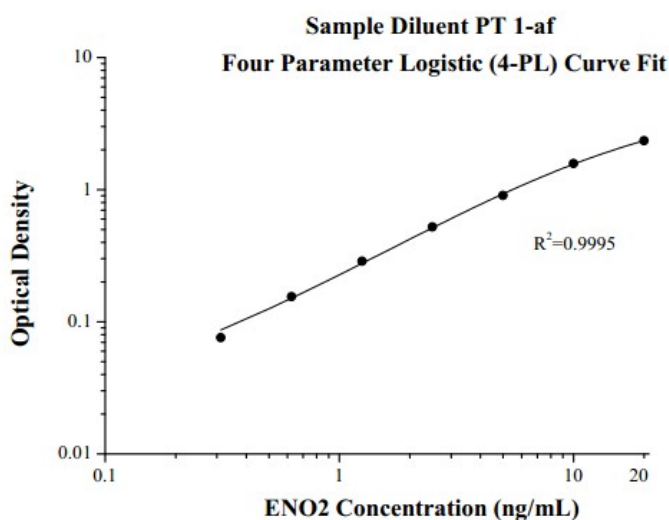
步骤	试剂	体积	孵育时间	洗涤次数	孵育温度
1	标准品或样本	100 μL	60 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
2	检测抗体(1×)	100 μL	60 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
3	HRP标记二抗(1×)	100 μL	40 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
4	显色 TMB	100 μL	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37°C孵育,避光
5	终止液	100 μL	0 分钟	不需要洗涤	-
6	加入终止液后以630 nm为校正波长,在450 nm处测量OD值,此过程建议不超过5分钟				

九：实验参数

9.1 参考标曲图



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.048 0.048	0.048	-
0.313	0.126 0.124	0.125	0.077
0.625	0.212 0.207	0.209	0.161
1.25	0.377 0.335	0.356	0.308
2.5	0.618 0.582	0.6	0.552
5	1.085 1.003	1.044	0.996
10	1.645 1.638	1.641	1.593
20	2.355 2.434	2.360	2.312



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.04 0.039	0.040	-
0.312	0.12 0.112	0.116	0.076
0.625	0.193 0.197	0.195	0.155
1.25	0.322 0.333	0.327	0.288
2.5	0.559 0.564	0.561	0.522
5	0.892 0.997	0.944	0.905
10	1.651 1.576	1.613	1.574
20	2.392 2.434	2.384	2.344

9.2 精密度

板内精密度：3个不同浓度的样本在板内重复测定 20次；

板间精密度：3个不同浓度的样本在板间重复测定 24次。

板内精密度 (CV内)				
样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%
1	20	2.3	0.1	6.0
2	20	7.6	0.6	7.8
3	20	16.1	0.9	5.5

板间精密度 (CV间)				
样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%
1	24	2.3	0.1	5.7
2	24	7.4	0.4	5.6
3	24	12.9	0.8	5.8

9.3 加标回收率

样本稀释后，在标曲范围内选择高、中、低3个浓度，进行人ENO2的加标回收率实验，结果如下：

样本类型	稀释倍数	均值 (%)	范围 (%)
人血浆	1:4	88	71-118
	1:8	86	72-110
细胞上清	1:2	90	73-110
	1:4	89	70-104

9.4 灵敏度

用20个重复的零孔平均OD值加上两倍标准差得到的OD值带入标准曲线拟合出对应的浓度值，此试剂盒中人ENO2的灵敏度为 0.11 ng/mL。

9.5 线性

人血浆、细胞上清加入高浓度的人ENO2梯度稀释后检测样本加标线性，线性数据如下。

(人血浆样本预先稀释2倍)

稀释倍数		人血浆 (样本稀释液 PT 1-ag)	细胞上清 (样本稀释液 PT 1-af)
1:2	均值 (%)	81	81
	范围 (%)	77-87	77-87
1:4	均值 (%)	83	83
	范围 (%)	76-87	76-87
1:8	均值 (%)	89	89
	范围 (%)	80-94	80-94
1:16	均值 (%)	89	93
	范围 (%)	87-91	88-97

十：参考文献

- 1.Verma M, et al. DNA sequences encoding enolase are remarkably conserved from yeast to mammals. Life Sci. 1994;55(12):893-9.
- 2.Isobe Y, et al. Circadian rhythm of enolase in suprachiasmatic nucleus depends on mitochondrial function. J Neurosci Res. 2011 Jun;89(6):936-44.