Mouse TNF-alpha FAST ELISA Kit

Catalog No.: RK04595

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小鼠血清、血浆、细胞培养上清或其它生物体液中 TNF-alpha 的含量。

产品检测原理

本实验采用双抗夹心 ELISA 法。将抗 TNF-alpha 抗体预先包被在酶标板上，向微孔中同时加入检测抗体和标准品/样品，样本中 TNF-alpha 与固相载体上的抗体以及检测抗体结合，完成“一步夹心”，孵育后，未结合的 TNF-alpha 和检测抗体在洗涤过程中会被洗去，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 TNF-alpha 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 TNF-alpha 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
小鼠 TNF-alpha 预包被酶标板 Mouse TNF-alpha Microwell Plate Coated	8×12	RM96092	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。
小鼠 TNF-alpha 冻干标准品 Mouse TNF-alpha Standard Lyophilized	2 支	RM96093	复溶后不建议再次使用。
小鼠 TNF-alpha 浓缩生物素化抗体（100×） Mouse TNF-alpha Concentrated Biotin Conjugate Antibody (100×)	1 ×60 μL	RM96094	可在 2-8°C 存储 1 个月。
浓缩链霉亲和素-HRP（100x） Streptavidin-HRP Concentrated (100×)	1 ×120 μL	RM96095	可在 2-8°C 存储 1 个月。

标准品/样本稀释液（R1） Standard/Sample Diluent (R1)	1 ×20 mL	RM00023	可在 2-8℃ 存储 1 个月。
生物素化抗体稀释液（R2） Biotin-Conjugate Antibody Diluent (R2)	1 ×12 mL	RM00024	
链霉亲和素-HRP 稀释液（R3） Streptavidin-HRP Diluent(R3)	1 ×12 mL	RM00025	
浓缩洗涤液（20x） Wash Buffer(20x)	1 ×30 mL	RM00026	
显色底物 TMB Substrate	1 ×12 mL	RM00027	
终止液 Stop Solution	1 ×6 mL	RM00028	
封板膜 Plate Sealers	4 张		
说明书 Specification	1		

*特别提示：表中所列为 96T 规格试剂盒，48T 试剂盒除标准品外，其他组分量均减半，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。

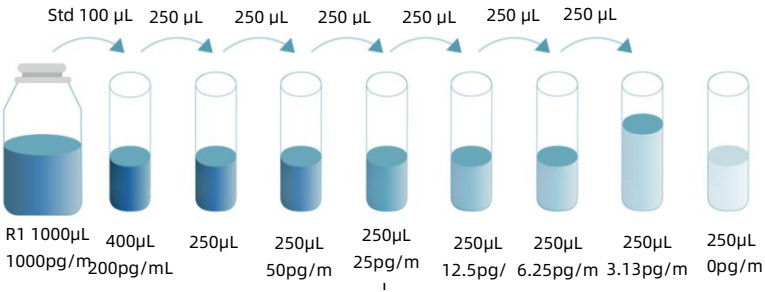
8. 终止液为腐蚀性液体，请做好相关防护。
9. 为保证最佳检测效果,相关试剂组分的保存请参照标签或是说明书。
10. 试剂配制后的混匀对检测结果非常重要,但部分蛋白或是抗体可能对剧烈的涡旋非常敏感,可能造成活性损失,请谨慎使用涡旋。
11. 请使用灭菌的耗材进行试剂配制，以免造成试剂污染，影响最终检测结果。
12. 为保证最佳检测效果,溶解后的标准蛋白及相关试剂的工作液不建议冻存后重复使用。
13. 产品在储存或是使用中，请注意避光。
14. 为保证最佳检测效果，在加不同样本时，请注意更换吸头。
15. 请严格按照说明书的要求进行试剂配制。如果您将分次使用试剂盒，请使用封口袋密封好预包被板，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：1000 xg 离心 10 分钟，及时检测；或将样本置于-20 至-70℃中分装保存（24 小时内检测可置于 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；或将样本置于-20℃至-70℃中分装保存（24 小时内检测可置于 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；或将样本置于-20℃至-70℃中分装保存（24 小时内检测可置于 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 1.0 mL 的标准品/样本稀释液 R1，轻轻混匀至少 15min，使冻干品完全溶解至浓度为 1000 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：200，100，50，25，12.5，6.25，3.13, 0 pg/mL)。



3. 浓缩生物素化抗体(100x):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 1：100 的比例稀释，注意：稀释后的工作液应在 30 分钟内使用。
4. 浓缩链霉亲和素-HRP（100x）：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 1：100 的比例稀释。注

意：稀释后的工作液应在 30 分钟内使用。

5. 洗涤液：在使用前用双蒸水或去离子水将洗涤液以 1：20 的比例稀释。

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：正常样本经测试，需进行 2 倍以上稀释。

   由于存在个体差异，请提前预估样本的浓度范围，并通过预实验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. 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，最后一次在吸水纸上彻底拍干板孔中的液体。
3. 根据使用量配制好生物素化抗体（100x）的工作液。
4. 每孔中分别先加入 50 μL 生物素化抗体工作液，再加入 50 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 1 小时。
5. 使用前 15 分钟配制好链霉亲和素-HRP（100x）的工作液。
6. 弃去孔中液体，重复步骤 2 中的洗涤步骤。
7. 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。
8. 在孵育期间，打开酶标仪预热 30 分钟后再进行测量。
9. 弃去孔中液体，重复步骤 2 中的洗涤步骤。
10. 向孔中加入 TMB 底物（100 μL/孔）。在 37℃下避光孵育 15-20 分钟。
11. 加入终止液（50 μL/孔），并立即放入酶标仪，在 5min 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

洗板 3 次

↓

向孔中先加入 50 μL 生物素化抗体工作液，再加入 50 μL 标准品或待测样本 37℃孵育 1 小时，然后洗板 3 次

↓

每孔加 100 μL 链霉亲和素-HRP 工作液

37℃孵育 0.5 小时，然后洗板 3 次

↓

加入 100 μL 底物溶液，37℃避光，孵育 15-20 分钟

↓

加入 50 μL 终止液

↓

5min 内检测 450 nm 波长的 OD 值

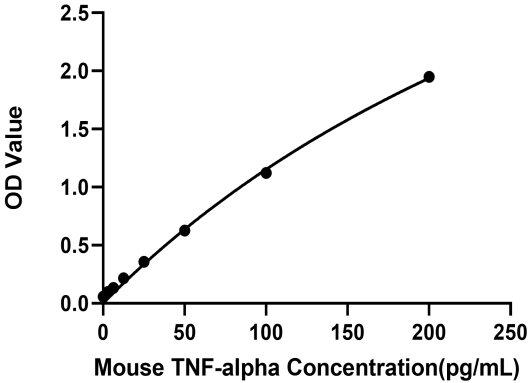
校正波长设置为 570 nm 或 630 nm

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 TNF-alpha 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

3.13-200 pg/ml

灵敏度

最低检测 TNF-alpha 可达 0.51 pg/mL。

重复测定空白样本 20 次，计算 20 次反应测得的均值（X̆）和标准差（SD），以X̆+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/天然小鼠 TNF-alpha。

以平行做特异性试验，与下列蛋白均未见发生交叉反应。

重组小鼠

IL-1α

IL-1β

IL-2

IL-4

IL-5

IL-6

IL-10

IL-12/IL-23 p40

IFN-β

IFN-γ

EGF

与浓度大于 10 ng/ml 的重组大鼠 TNF-alpha 有 2.2%交叉反应。

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)	7.81	25	150	7.81	25	150
标准偏差（SD）	0.60	1.52	11.16	0.73	1.77	13.91
变异系数 CV(%)	7.62	6.06	7.44	9.36	7.06	9.27

回收率

将高、中、低 3 个不同浓度的 TNF-alpha 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)	90	83-103
血清(n=5)	100	90-110

线性

分别往 5 个样本中添加已知浓度的目标蛋白，做回收实验，得出回收率范围及平均回收率。将 5 个样本分别稀释 2 倍，4 倍，8 倍，16 倍做回收实验，得出回收率范围及平均回收率。

/	/	细胞上清(n=5)	血清(n=5)
1:2	平均符合率（%）	92	86
	范围（%）	85-102	80-94
1:4	平均符合率（%）	110	93
	范围（%）	92-113	90-110
1:8	平均符合率（%）	96	95
	范围（%）	95-100	93-97
1:16	平均符合率（%）	93	86
	范围（%）	90-106	84-96

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 15-25min
	终止后，未及时读数	加入终止液后，在 5min 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。