Mouse TNF alpha High Sensitivity ELISA Kit

Catalog No.: RK04875

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，向微孔中分别加入标准品和样品，样本中 TNF alpha 与固相载体上的抗体结合。孵育后，未结合的样品在洗涤过程中会被洗去，加入抗 TNF alpha 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 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 x12	RM97212	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	RM97213	复溶后不建议再次使用。
小鼠 TNF alpha 浓缩生物素化抗体（100x） Mouse TNF alpha concentrated Biotin Conjugate Antibody (100x)	1 x120 μL	RM97214	可在 2-8°C 存储 1 个月。
浓缩链霉亲和素-HRP（100x） Streptavidin-HRP Concentrated (100x)	1 x120 μL	RM97215	可在 2-8°C 存储 1 个月。

标准品/样本稀释液（R1） Standard/Sample Diluent (R1)	1 x20 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 x12 mL	RM00024	
链霉亲和素-HRP 稀释液（R3） Streptavidin-HRP Diluent(R3)	1 x12 mL	RM00025	
浓缩洗涤液（20x） Wash Buffer(20x)	1 x30 mL	RM00026	
显色底物 TMB Substrate	1 x12 mL	RM00027	
终止液 Stop Solution	1 x6 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。

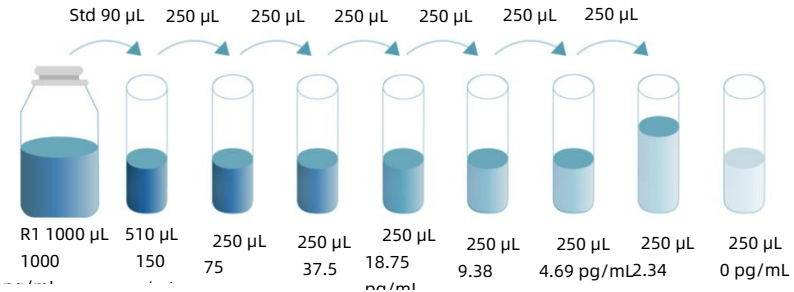
7. 相关试剂中可能存在有害物质，使用中请注意佩戴手套，必要时佩戴护目镜。
8. 终止液为腐蚀性液体，请做好相关防护。
9. 为保证最佳检测效果,相关试剂组分的保存请参照标签或是说明书。
10. 试剂配制后的混匀对检测结果非常重要,但部分蛋白或是抗体可能对剧烈的涡旋非常敏感,可能造成活性损失,请谨慎使用涡旋。
11. 请使用灭菌的耗材进行试剂配制，以免造成试剂污染，影响最终检测结果。
12. 为保证最佳检测效果,溶解后的标准蛋白及相关试剂的工作液不建议冻存后重复使用。
13. 产品在储存或是使用中，请注意避光。
14. 为保证最佳检测效果，在加不同样本时，请注意更换吸头。
15. 请严格按照说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 xg 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：150，75，37.5，18.75，9.38，4.69，2.34，0 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：样本经测试，需进行 5 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。
3. 在空白孔中添加 100 μL 标准品/样本稀释液（R1）。
4. 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 2 小时。
5. 在使用前 15 分钟配制好生物素化抗体（100x）工作液。
6. 弃去孔中液体，重复步骤 2 中的洗涤步骤。
7. 每孔中加入生物素化抗体工作液（100 μL/孔），并盖上新的封板膜，37℃下孵育 1 小时。
8. 使用前 15 分钟配制好链霉亲和素-HRP（100x）的工作液。
9. 弃去孔中液体，重复步骤 2 中的洗涤步骤。
10. 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。
11. 预热酶标仪。
12. 弃去孔中液体，重复步骤 2 中的洗涤步骤。
13. 向孔中加入 TMB 底物（100 μL/孔）。在 37℃下避光孵育 15-20

分钟。

14. 加入终止液（50 μL/孔），并立即放入酶标仪，在 5min 内测定每个孔 450nm 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

↓

向孔中加入 100 μL 标准品或待测样本

37℃孵育 2 小时，然后洗板 3 次

↓

每孔加 100 μL 生物素化抗体工作液

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 450nm 波长的 OD 值

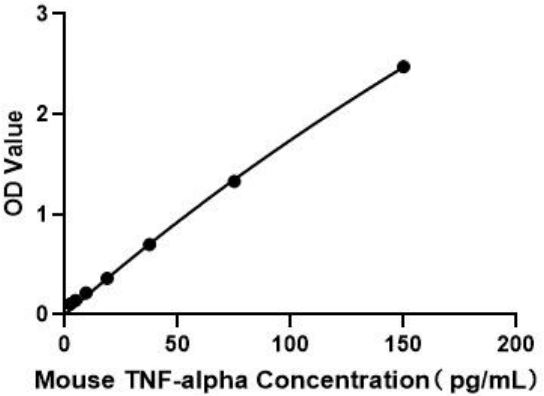
校正波长设置为 570nm 或 630nm

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

2.34-150 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（$\bar{X}$）和标准差（SD），以$\bar{X}$+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/天然小鼠 TNF alpha。

以 10 ng/mL 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 0.73%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)	6	18.75	112.5	6	18.75	112.5
标准偏差（SD）	0.22	0.84	6.08	0.44	1.54	7.99
变异系数 CV(%)	3.4	4.5	5.4	7.4	8.2	7.1

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)	91	84-103
血清(n=5)	101	90-111

线性

将高浓度 TNF alpha 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（%）	92	90
	范围（%）	85-102	80-98
1:4	平均符合率（%）	100	103
	范围（%）	92-113	90-110
1:8	平均符合率（%）	112	95
	范围（%）	95-120	93-97
1:16	平均符合率（%）	113	86
	范围（%）	90-116	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。