

## 大鼠肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )ELISA 试剂盒

货号:	JYM0635Ra-T	检测范围:	15.625pg/mL-1000pg/mL
种属:	大鼠	保存温度:	2-8 $^{\circ}$ C
规格:	96T/48T	有效期:	6个月
用途:	用于体外定量检测检测细胞培养上清、血清、血浆中大鼠TNF- $\alpha$ 。		

### ※ 实验原理

本试剂盒采用双抗体夹心法 ELISA 技术：将捕获抗体包被于酶标板上，捕获样品及标准品中的待测物 TNF- $\alpha$ ，洗涤后，再加入生物素标记的检测抗体进行孵育后清洗，形成“捕获抗体-抗原-检测抗体”免疫复合物，随后加入链霉亲和素偶联的辣根过氧化物酶进行孵育，待孵育结束后清洗，接着加入 TMB 显色后，若样本中有待测物则显蓝色，加入终止液停止反应。检测过程中游离的成分均被洗去，用酶标仪在 450 nm 处测 OD 值，颜色的深浅和样品中的待测物的含量呈正比，通过绘制标准曲线计算出样本中 TNF- $\alpha$  的浓度。

### ※ 注意事项

1. 本试剂盒仅供教研使用，不可作为体外诊断依据；
2. 预包被酶标板拆封后，未使用的板条请装入自封袋密封。为降低不同时间检测板内变异系数，间隔 48 小时内检测可 2-8 $^{\circ}$ C 保存，如果间隔时间较长，请-20 $^{\circ}$ C 保存，并在下次检测时重新绘制标准曲线；
3. 浓缩洗涤液、浓缩生物素化抗体、浓缩 HRP 酶结合物请按要求稀释后使用，按需配置，现配现用；
4. 显色液 A 和显色液 B 建议先用一次性试管混匀后再添加到酶标板中，现配现用。配好的显色液应保持无色，直到添加到板中；
5. 此试剂盒提供的终止液为稀硫酸溶液，具有一定腐蚀性，应谨慎操作。如果不小心沾到皮肤上，请立即擦去，并用清水冲洗；
6. 请严格按照说明书进行操作；如有疑问，请一定与技术工程师确认后再进行操作，避免样本和时间上的浪费；
7. 不同批号试剂不建议混用，请勿使用其他品牌来源的试剂；
8. 封板膜、吸水纸、加样过程中所用的 EP 管和吸头为一次性使用，严禁混用。

※ 试剂盒组成

中文名称	96T 配置	48T 配置	保存条件
预包被酶标板	8 孔×6 条	8 孔×12 条	2-8℃
标准品	1 支×100μL	1 支×200μL	
100×生物素化抗体	1 支×50μL	1 支×100μL	
100×SA-HRP	1 支×50μL	1 支×100μL	
20×浓缩稀释液	1 瓶×15mL	1 瓶×25mL	
显色液 A	1 瓶×3mL	1 瓶×6mL	
显色液 B	1 瓶×3mL	1 瓶×6mL	
终止液	1 瓶×3mL	1 瓶×6mL	
20×浓缩洗涤液	1 瓶×15mL	1 瓶×25mL	
封板膜	4 张	4 张	RT
产品说明书	1 份	1 份	

※ 需要而未提供的物品:

仪器设备	其它
含 450nm 检测波长的酶标仪	吸水纸或者抽纸
各种量程移液器	蒸馏水或去离子水
可提供 37℃ 环境的恒温箱或培养箱	各种规格吸头和 EP 管

※ 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静置 30min 以上, 不超过 2 小时, 然后 2-8℃, 2500-3500×g 离心 20min, 仔细收集上清;
- 2、**血浆**: 应根据标本的要求选择 EDTA 或柠檬酸钠作为抗凝剂, 样品采集后 30min 内在 2-8℃, 3000×g 离心 15min, 仔细收集上清。保存过程中如有沉淀形成, 应再次离心;
- 3、**尿液**: 用无菌管收集, 2-8℃, 2500-3500×g 离心 10min, 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**: 收集液体后于 2-8℃, 2500-3500×g 离心 20min, 除去杂质及细胞碎

片，取上清检测。

- 5、**细胞裂解液**：贴壁细胞用预冷的 PBS(0.01M,pH=7.4)轻轻清洗，然后用胰蛋白酶消化，2-8℃，1000×g 离心 5min 后收集细胞；悬浮细胞可直接离心收集。收集的细胞用冷的 PBS 洗涤 3 次。每  $1 \times 10^6$  个细胞中加入 150-200 $\mu$ L PBS 重悬，并通过反复冻融或超声使细胞破碎(推荐在 PBS 中加入蛋白酶抑制剂；若含量很低可减少 PBS 的体积)。将提取液于 2-8℃，10000×g 离心 10min，取上清检测；
- 6、**组织样本**：用预冷的 PBS(0.01M,pH=7.4)冲洗组织，去除残留血液，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 1 g 的组织样品对应 9 mL 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)加入匀浆器中，在冰上充分研磨。为了进一步裂解组织细胞，可以对匀浆液进行反复冻融或超声破碎。最后将匀浆液于 2-8℃，10000×g 离心 5-10min，取上清检测；
- 7、**其它生物标本**：2-8℃，2500-3500×g 离心 20min，仔细收集上清。

**样品外观**：样品应清澈透明，悬浮物应离心去除。

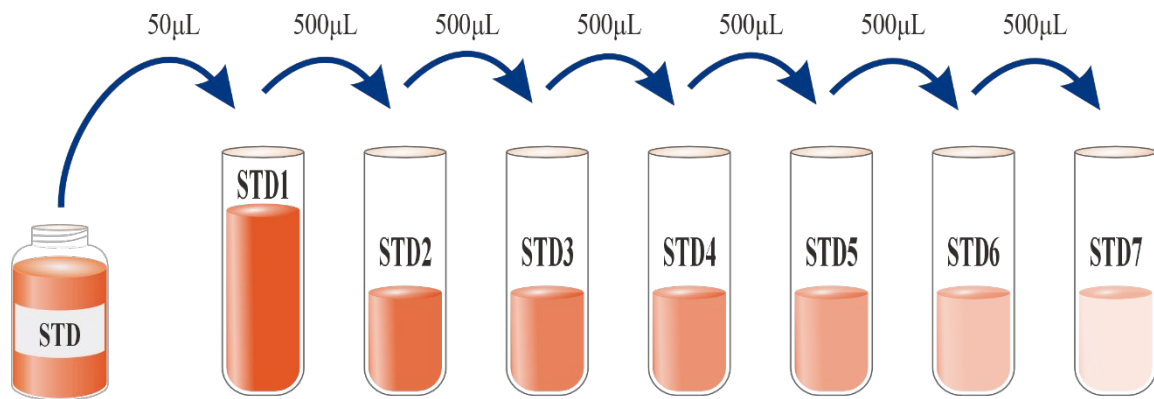
**样品保存**：样品收集后尽快检测。若不能及时检测，请按一次使用量分装，冻存于-20℃(1 个月内检测)，或-80℃(6 个月内检测)，避免反复冻融。

#### ※ 试剂准备工作

使用前将所有试剂置于室温平衡 30 分钟左右。

**洗涤液/稀释液配置**：如果洗涤液/稀释液 (20×) 有晶体析出，需在 37℃下加热至晶体全部溶解。用蒸馏水 1:20 稀释 (例如：1mL 浓缩洗涤液加入 19mL 的蒸馏水)。

**标准品配置**：试剂盒中取出标准品，准备 7 个试管，先从 20ng/mL 标准品 (200 $\mu$ L) 按需吸取一定量用 1×稀释液稀释至 1000pg/mL (例：50 $\mu$ L 的标准品母液+950 $\mu$ L 的 1×稀释液，制备得到 1000 $\mu$ L 的 1000pg/mL 浓度标准品)，随后在 6 个试管中分别加入 500 $\mu$ L 的 1×稀释液，在这 6 个单独的试管中将 1000pg/mL 标准品依次 2 倍倍比稀释至 6 个梯度，共配制 7 个浓度的标准品，依次为：1000pg/mL、500pg/mL、250pg/mL、125pg/mL、62.5pg/mL、31.25pg/mL、15.625pg/mL，从最高浓度标准品溶液中吸取 500 $\mu$ L 标准品到下一个试管中，轻轻吹打混匀，以此类推进行标准品的倍比稀释 (如图所示)，1×稀释液用作零浓度标准品(0pg/mL)。



稀释后各管中标准品浓度如下(单位: pg/mL)

STD	STD1	STD2	STD3	STD4	STD4	STD6	STD7
20ng/mL	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.625

**抗体工作液配置:** 使用前 10 分钟, 将 100×生物素化抗体于 1000×g 离心 1 分钟, 随后用 1×稀释液将 100×生物素化抗体稀释成 1×生物素化抗体工作液, 根据所需用量当日配置当日使用。

**酶结合物工作液配置:** 使用前 10 分钟, 将 100×SA-HRP 溶液于 1000×g 离心 1 分钟, 随后用 1×稀释液将 100×SA-HRP 稀释成 1×SA-HRP 工作液, 根据所需用量当日配置当日使用。

**备注:** 如待测样本中 TNF-α 浓度高于标准品最高值, 请根据实际情况选择适当的稀释倍数。

## ※ 实验步骤

### 所有标准品、样品建议复孔检测

1. 酶标板准备: 确定实验所需要的孔数, 取下其它不使用的板条放回装有干燥剂的密封袋;
2. 样本孵育: 分别加入 100µL 不同浓度的标准品以及预处理过的待测样品 (建议样本用通用稀释液最少稀释 1 倍上样, 目的是减少基质效应, **空白孔加 1×稀释液**), 盖上封板膜, 37℃避光反应 1 h。孵育结束后, 每孔加入 300µL 1×洗涤缓冲液, 轻轻晃动 30 秒, 甩干并在吸水纸上拍干, 以这种方式清洗 3 次;
3. 抗体孵育: 每孔加入 100µL 生物素化抗体工作液, 轻轻混匀, 盖上封板膜, 37℃避光反应 1 h。孵育结束后, 重复步骤 2 中的清洗方式清洗 4 次;
4. 酶标孵育: 每孔加入 100µL 1×SA-HRP 工作液, 盖上封板胶纸, 37℃避光反应 30min, 重复步骤 2 中的清洗方式清洗 4 次, **在新的吸水纸上拍干;**

5. 底物显色：将显色液 A 和显色液 B 按照 1: 1 比例混匀配成底物显色液（按需配置，确认此时应无色透明），每孔加入 100 $\mu$ L 配好的显色液，盖上封板膜，37 $^{\circ}$ C 避光反应 15 分钟；
6. 终止反应：待显色反应结束后，每孔加入 50 $\mu$ L 终止液，轻轻晃动酶标板混匀，5 分钟内用预热完成的酶标仪在 450nm 处测吸光值。

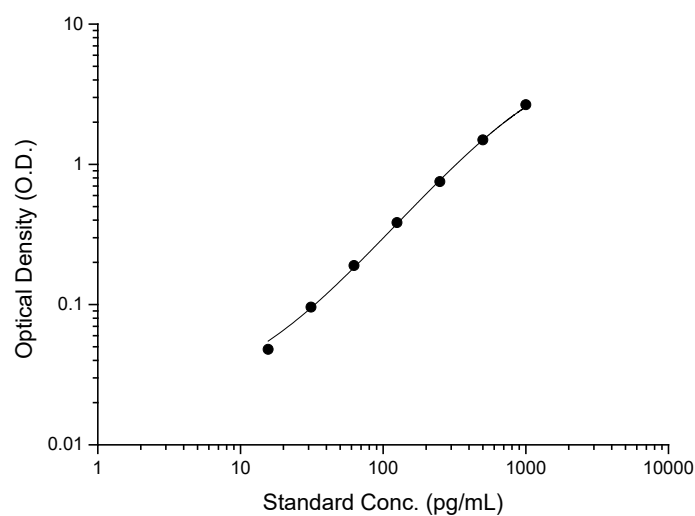
### ※ 结果的计算

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)。或者使用能够生成四参数逻辑 (4-P) 曲线拟合的计算机软件来创建标准曲线。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。

### ※ 示例数据

以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验数据建立标准曲线。

标准品浓度 (pg/mL)	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.625	0
OD 值	2.702	1.533	0.792	0.423	0.229	0.135	0.087	0.039
校正 OD 值	2.663	1.494	0.753	0.384	0.19	0.096	0.048	0



本图所示标准曲线仅供示例，结果计算应以同次试验标准品所绘标准曲线为准计算样本结果。

### 精密度

板内，板间变异系数均<10%。

板内精密度：在同一块板上重复检测三个已知浓度的样品 20 次，计算浓度的变异系数 (CV)。

板间精密度：在三块板子上对三个已知浓度的样品分别进行 20 次重复检测，计算浓度的变异系数 (CV)。

样本	板内精密度			板间精密度		
	1	2	3	1	2	3
数量	20	20	20	20	20	20
平均值 (pg/mL)	31.12	62.44	124.85	31.34	62.47	124.97
标准差	0.54	1.55	4.37	0.71	2.13	4.22
变异系数 (%)	1.75	2.49	3.5	2.26	3.41	3.38

### 回收率

分别往不同样本中添加已知浓度的大鼠 TNF- $\alpha$ ，做回收实验，得出回收率范围和平均回收率。

样本类型	范围 (%)	平均回收率 (%)
血清(n=8)	89-99	96
血浆(n=8)	93-103	96
细胞培养上清(n=8)	100-119	107

### 灵敏度

经样本测试，本试剂盒的检测灵敏度为 7.81pg/mL。

### 线性关系

将高浓度大鼠TNF- $\alpha$ 加入样本中，在标准曲线范围内分别稀释2倍，4倍，8倍，16倍做回收实验，得出回收率及平均回收率。

		血清 (n=4)	细胞培养基(n=4)
1: 2	回收率范围 (%)	95-114	95-105
	平均回收率 (%)	96	99
1: 4	回收率范围 (%)	99-117	97-114
	平均回收率 (%)	102	108
1: 8	回收率范围 (%)	103-119	98-117
	平均回收率 (%)	108	112
1: 16	回收率范围 (%)	108-120	105-123
	平均回收率 (%)	113	118

### 特异性

该试剂盒测定可识别重组大鼠 TNF- $\alpha$ 。

其他相关蛋白在稀释缓冲液中制备为 50ng/mL，并测定交叉反应性。没有观察到明显的交叉反应。

