

# 小鼠肿瘤坏死因子 $\alpha$ 酶联免疫试剂盒

## Mouse TNF- $\alpha$ ELISA Kit

用于血清，血浆，细胞上清及其他生物体液中

小鼠肿瘤坏死因子  $\alpha$  的检测

货号：A1010A0203

96 tests

仅供科研使用，勿用于药物、临床检测

### 检测原理：

本试剂盒采用双抗夹心法。用抗 Mouse TNF- $\alpha$  抗体包被于酶标板上，标准品和样本中的 Mouse TNF- $\alpha$  与单抗结合，加入生物素化的抗 Mouse TNF- $\alpha$ ，形成免疫复合物连接在板上，辣根过氧化物酶标记的 streptavidin 与生物素结合，加入底物工作液显蓝色，最后加终止液，在 450nm 处测 OD 值，Mouse TNF- $\alpha$  浓度与 OD 值成正比，可通过绘制标准曲线求出标本中 Mouse TNF- $\alpha$  的浓度。

### 试剂盒组份（2-8℃保存）

1. Mouse TNF- $\alpha$  酶标板（coated wells），12\*8wells（单孔可折），1 plate；
2. Mouse TNF- $\alpha$  标准品 20 ng（standards），2 vial；
3. Mouse TNF- $\alpha$  100×生物素化二抗（Biotinylated Antibody），120μL，1 vial；
4. Mouse TNF- $\alpha$  80×亲和链霉素辣根过氧化物酶结合物（Streptavidin HRP Conjugate），150μL，1 vial；
5. 稀释液 I（Assay Diluent I），12 mL，1 vial；
6. 稀释液 II（Assay Diluent II），12 mL，1 vial；
7. 稀释液 III（Assay Diluent III），12 mL，1 vial；
8. 20×浓缩洗涤液（Wash Buffer），50 mL，1 vial；
9. 显色液 A（Color Reagent A），6 mL，1 vial；
10. 显色液 B（Color Reagent B），6 mL，1 vial；
11. 终止液（Stop Solution），12 mL，1 vial；

### 未提供的试剂、仪器和耗材：

1. 单道或多道（8道或12道）移液器及移液器枪头：10-200μL 和 50-1000μL；
2. 多道（8道或12道）移液器试剂存放槽；
3. EP 管及试剂配置容器；

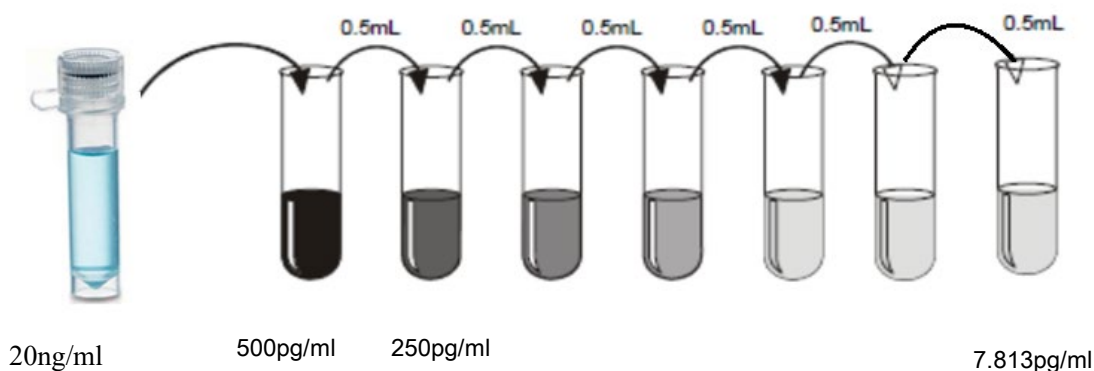
4. 圆柱形量筒：100mL，200mL，500mL 和 1L；
5. 可在 450nm 处进行读数的酶标仪；洗瓶或自动洗板机；
6. 蒸馏水或去离子水；封板膜或板盖；乳胶手套；吸水纸；

#### 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°C。使用后立即冷藏保存试剂。
2. 洗板不正确会导致不准确的结果。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出来的强烈气体。任何漂白成分都会破坏试剂盒中反映试剂的生物活性。
8. 标准孔及待测样本均建议做复孔，每次测定应同时做标准曲线，请合理安排预实验。
9. 不能使用过期产品。

#### 样本与试剂准备：

1. **样本：**本试剂盒可检测血清，血浆（EDTA，肝素抗凝），细胞培养上清液，组织匀浆等生物学样本。样本储存要求 2-8°C 保存 48 小时以内，更长时间需冷冻（-20°C 或 -80°C）保存，避免反复冻融。如样本 Mouse TNF- $\alpha$  含量过高，可用稀释液 I 进行稀释。
2. **标准品配制：**将 20ng 标准品离心后，加入 1000 $\mu$ L 的稀释液 I 配制成浓度为 20ng/mL 的标准品溶液，轻轻振荡混匀。取 975 $\mu$ L 稀释液 I 到空 EP 管中，加入 25 $\mu$ L 浓度为 20ng/mL 的标准品，混匀，配成浓度为 500pg/mL 的标准品溶液（标准曲线最高点）；再准备六支 EP 管，分别加入 500 $\mu$ L 稀释液 I，吸取 2000pg/mL 的标准品溶液 400 $\mu$ L 加入第一管中，充分混匀，从第一管中取 500 $\mu$ L 加到第二管中，充分混匀，如此反复对半稀释至浓度 7.813pg/mL 的标准品溶液；另取一空白 EP 管加入足量的稀释液 I，设为空白对照。



3. **1×Biotinylated Antibody** : 用稀释液 II 按 1:100 倍稀释 100×生物素化二抗。
4. **1×Streptavidin-HRP Conjugate** : 用稀释液 III 按 1:80 倍稀释 80×亲和链霉素辣根过氧化物酶结合物。
5. **显色液配制** : A 液和 B 液做 1 : 1 配制，即配即用，可根据使用量临时配制（使用前 15 分钟内配制），不要配制过多的显色液。
6. **1×洗涤液配制** : 用蒸馏水 1 : 20 倍稀释（示例：1mL 20×浓缩洗涤液加入 19mL 蒸馏水）；

### 操作步骤：

样本，细胞上清，细胞裂解液，脑脊液，以及其他生物学样本均需要在正式实验前预实验确认稀释倍数；血清样本一般情况下建议按照 50μL 上样。

酶标板是 12\*8wells 的 lockwell 形式，属于单孔可折形式，可以按照自己的需要每次拆下相应的板条来进行实验；如果第一次使用 biotnt 的这款试剂盒，建议您在进行大批量实验之前先进行预实验；

预实验方式：选用 1 条酶标板，加入标准品 500pg/ml，7.813pg/ml，0 孔；另外，再选择您待测的两个样本，第一个样本选择三个稀释梯度；第二个样本选择两个稀释梯度来进行预实验；

实验步骤：

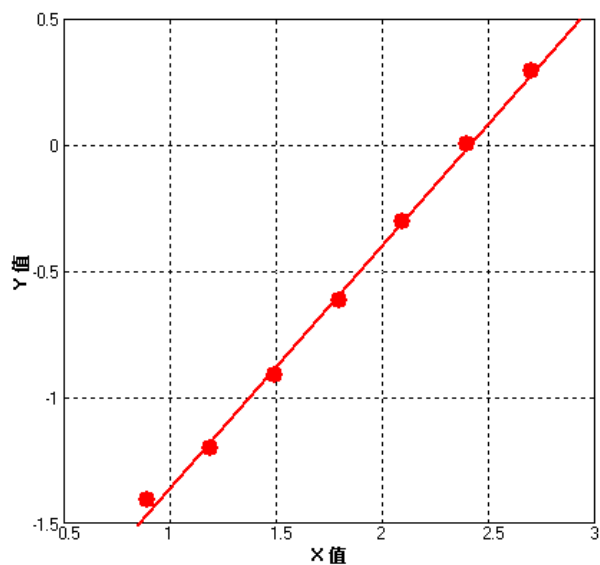
1. 加样：加入相对应标准品 100μL，加入待测样品 50μL、稀释液 I 50ul（样本已经稀释 2 倍回归计算时需乘以稀释倍数 2），封板，充分混匀，室温温育 120 分钟；
2. 洗板：用 1×洗涤液将反应板充分洗涤 3 次，在吸水纸上拍干；
3. 每孔加入已稀释 1× Biotinylated Antibody 100μL，封板，室温温育 60 分钟；
4. 洗板：同第二步；
5. 每孔加 1×Streptavidin- HRP 100μL，封板，室温温育 30 分钟；
6. 洗板：同第二步；
7. 每孔加入已配制的显色工作液 100μL，将反应板置暗处室温 5-15 分钟，目测标准品和样本的板孔变为蓝色，酶标仪 620-630nm 进行读数并保存（第一次数据），标准品孔的最高点读数 OD 值在 0.7-1.0 之间，可以进行下一步终止反应；

8. 每孔加入 100 $\mu$ L 终止液，混匀；如果颜色呈现绿色或者颜色的变化明显不均匀，请轻轻叩击板框，充分混匀。
9. 在 5 分钟内进行酶标仪读数，设置双波读数（第二次数据），酶标仪主波长 450nm，副波长 620-630nm 检测吸光度。校准后的 OD 值为 450 nm 的测定值减去 620-630 nm 的测定值。仅使用 450 nm 测定会导致 OD 值偏高，并且准确度降低。
10. 如果酶标仪没有 620-630nm 的波长，也可以根据酶标仪的情况选择 570-650nm 的波长作为替代。

### 结果计算与判断：

1. 所有 OD 值都应减除空白值后再计算；先计算 450-630nm 的数据（第二次数据）；
2. 以标准品 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.813, 0pg/mL 为横坐标，450-630nm 的 OD 值为纵坐标，画出标准曲线。
3. 根据样本 OD 值在该曲线图上查出相对应 Mouse TNF- $\alpha$ 含量，如样本有稀释，请再乘上稀释倍数。如果样本没有进行预稀释，则稀释倍数为 2。计算出的数值应该乘以 2。
4. 推荐采用双对数方式进行数据拟合。如下是示例数据：

| Standard (pg/mL) | O.D. (450 nm-630nm) | Mean  | Zero Subtracted(Std.)-(S1) | Standard |
|------------------|---------------------|-------|----------------------------|----------|
| 500pg/ml         | 2.023,2.03          | 2.027 | 1.974                      |          |
| 250pg/ml         | 1.054,1.058         | 1.056 | 1.003                      |          |
| 125pg/ml         | 0.546,0.552         | 0.549 | 0.496                      |          |
| 62.5pg/ml        | 0.293,0.296         | 0.295 | 0.242                      |          |
| 31.25pg/ml       | 0.172,0.18          | 0.176 | 0.123                      |          |
| 15.625pg/ml      | 0.113,0.118         | 0.116 | 0.063                      |          |
| 7.813pg/ml       | 0.089,0.095         | 0.092 | 0.039                      |          |
| 0pg/ml           | 0.05,0.056          | 0.053 | 0.000                      |          |

Mouse TNF- $\alpha$ 标准曲线 ( pg/mL )**试剂盒数据批内差 ( Intra-Assay ) :**

选取不同浓度的血浆样本各 3 例在同一次验证实验中加样 20 孔，来验证批内差，检测结果如下：

| Sample                       | 1     | 2      | 3      |
|------------------------------|-------|--------|--------|
| N                            | 20    | 20     | 20     |
| Mean (pg/mL)                 | 34.03 | 167.05 | 334.21 |
| Standard Deviation(pg/ml)    | 2.16  | 8.35   | 14.4   |
| Coefficient of Variation (%) | 6.35  | 5      | 4.31   |

**试剂盒数据批间差 ( Inter-Assay ) :**

选取不同浓度的血浆样本各 3 例在 10 次不同的实验中进行检测，来验证批间差，检测结果如下：

| Sample                       | 1     | 2      | 3      |
|------------------------------|-------|--------|--------|
| N                            | 10    | 10     | 10     |
| Mean (pg/mL)                 | 35.62 | 170.14 | 335.96 |
| Standard Deviation(pg/ml)    | 3.03  | 10.55  | 21.2   |
| Coefficient of Variation (%) | 8.5   | 6.2    | 6.31   |

**试剂盒灵敏度 ( Sensitivity ) :**

本试剂盒检测 Mouse TNF- $\alpha$  的最低浓度为 15.6 pg/mL，验证实验选取两条标准品进行梯度稀释确认 15.6 pg/mL 以上浓度的反应孔 OD 值呈正相关线性分布，Mouse TNF- $\alpha$  浓度在 15.6- 31.3 pg/mL 之间样本可以被检测到但会有较大偏差，低于 15.6 pg/mL 无法被检出。

#### 试剂盒数据回归性 ( Recovery ) :

选取血清、血浆、细胞上清等不同类型的小鼠样本按低浓度、中浓度、高浓度分组稀释做回归性验证实验，将线性回归后的浓度值与理论浓度值相比较统计结果如下：

| 样本类型 | Average Recovery% | 范围%    |
|------|-------------------|--------|
| 血清   | 105               | 95-110 |
| 血浆   | 103               | 95-112 |
| 细胞上清 | 98                | 90-105 |

#### 试剂盒数据特异性 ( Specificity ) :

本 ELISA 试剂盒可以检测自然或重组 Mouse TNF- $\alpha$  蛋白。本试剂盒不与以下蛋白产生交叉反应：Mouse VEGF; Mouse IL-2; Mouse sTRAIL; Mouse sRANKL; Mouse CD40L; Human VEGF; Human IL-2; Human sTRAIL; Human sRANKL; Human CD40L; Human FasL; Human TWEAK; Human 4-1BBL; Human TNF Alpha; Human TNF Beta; Human sTNF-R1 and Human sTNF -R2。试剂盒与 rat TNF- $\alpha$  有交叉反应。