



Mouse TNF α Quick ELISA Kit

产品编号: FEK0527

规格: 96T

检测范围: 15.6pg/ml→1000pg/ml

特异性: 系统和其它细胞因子无交叉反应。

敏感性: <1pg/ml

保存: 2-8℃ (频繁使用时); -20℃ (长时间不用时)。

有效期: 6个月(4℃); 12个月(-20℃)。

用途: 用于体外定量分析小鼠血清、血浆、细胞裂解液或细胞培养上清。

工作原理

博士德所提供的小鼠 TNF α Quick ELISA Kit, 预先包被的抗体为单克隆抗体。检测相抗体为辣根过氧化物酶连接的多克隆抗体。标准品、样品加入酶标板孔, 再加入辣根过氧化物酶连接抗体反应后, 经过洗液的彻底洗涤后用底物 TMB 显色。TMB 在辣根过氧化物酶的催化下转化成蓝色, 并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的 TNF α 呈正相关。

试剂盒中内容(96孔)

内容	规格	数量
预包被抗小鼠 TNF α 抗体的 96 孔板	96T	1 板
重组小鼠 TNF α 冻干标准品(Standard)	10ng/管	2 管
HRP 连接抗小鼠 TNF α 抗体 (HRP - linked Antibody)	6ml	1 瓶
样品稀释液(Sample Diluent)	15ml	1 瓶
TMB 显色液(Color Developing Reagent)	10ml	1 瓶
终止液(Stop Solution)	10ml	1 瓶
TBS-T 洗涤缓冲液(25×TBS-T Wash Buffer)	12ml	1 瓶
封板膜		2 张

注意: 使用前请检查试剂盒中试剂的标签和数量与表格是否一致

需要而未提供的试剂和器材

1. 标准规格酶标仪。
2. 自动洗板机。
3. 振荡器。



4. 系列可调节移液器及吸头，一次检测样品较多时，最好用多通道移液器。
5. 干净的试管和 Eppendorf 管。
6. 用去离子水将 $25\times$ TBS-T 洗涤缓冲液稀释 25 倍，成 $1\times$ TBS-T 洗涤缓冲液。

注意事项

1. 使用前 TMB 显色液应为无色透明溶液，若发现颜色异常，请及时与厂家联系。
2. 用户在初次使用试剂盒时，应将各种试剂管离心数分钟，以便试剂集中到管底。
3. 要严格避免操作过程中酶标板干燥。干燥会使酶标板上生物成份迅速失活。
4. 为免交叉污染，要避免重复使用手中的吸头和试管。
5. 禁止混用不同批次试剂盒内的试剂。
6. 本公司提供的 96 孔酶标板是单条可拆型酶标板，用户可按需求使用；剩余的酶标板请按保存条件贮存。
7. 揭封板膜和覆盖封板膜时应避免用力过大导致液体溅出。

洗板方法

手工洗板方法：吸去（不可触及板壁）或甩掉酶标板内的液体；在实验台上铺垫几层吸水纸，酶标板朝下用力拍几次；将 $1\times$ TBS-T 洗涤缓冲液至少 300ul 注入孔内，浸泡 1-2 分钟。根据需要，重复此过程数次。

自动洗板：如果有自动洗板机，应在熟练使用后再用到正式实验过程中。

样品的准备和保存

样品如果不立即分析，应分装后冷冻保存，且避免反复冻融。

细胞培养上清——离心去除沉淀，立即分析或分装后 -20°C 冷冻保存。

血清——用干净试管收集血液，室温凝固 30 分钟，离心 $2000\times g$ 20 分钟，收集血清。立即分析或分装后 -20°C 冷冻保存。

血浆——采用肝素、柠檬酸盐或 EDTA 抗凝，抽血后 30 分钟内在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 离心 $2000\times g$ 20 分钟。为消除血小板的影响，建议在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 进一步离心 $10000\times g$ 10 分钟。立即分析或分装后 -20°C 冷冻保存。

细胞裂解液——对于贴壁细胞，去除培养液，用 PBS、生理盐水或无血清培养液洗一遍。加入适量裂解液，用枪吹打数下，使裂解液和细胞充分接触。通常 10 秒后，细胞就会被裂解。对于悬浮细胞，离心收集细胞，用 PBS、生理盐水或无血清培养液洗一遍。加入适量裂解液，用枪吹打把细胞吹散，用手指轻弹以充分裂解细胞。充分裂解后， $10000-14000\times g$ 离心 3-5 分钟，取上清。立即分析或分装后 -20°C 冷冻保存。

样品稀释的一般原则

用户须估计样品待测因子的含量，决定适当的稀释倍数，以使稀释后样品中待测因子的浓度处于 ELISA 试剂盒的最佳检测范围。根据待测因子含量高、中、低的不同，分别采取不同的稀释方案：

高——指待测因子在 $10-100\text{ng/ml}$ 。一般按 1: 100 稀释。297ul 样品稀释液加 3ul 样品。

中——指待测因子在 $1-10\text{ng/ml}$ 。一般按 1: 10 稀释。225ul 样品稀释液加 25ul 样品。

低——指待测因子在 $15.6-1000\text{pg/ml}$ 。按 1: 2 稀释。120ul 样品稀释液加 120ul 样品。

特低——指待测因子 $\leq 15.6\text{pg/ml}$ 。样品一般不做稀释，或按 1: 2 稀释。

以上方案仅供参考，样品的稀释应有详细记录。



试剂的准备和保存

A. TNF α 标准品的稀释和使用：在使用前 1 小时内准备。

试剂盒提供 2 管标准品，每管 10ng，每次使用 1 管。

1. 配制 10ng/ml 标准品：取 1ml 样品稀释液加入标准品管内，盖好后静置 10 分钟以上，然后反复颠倒/搓动以助溶解。
2. 配制 1000pg/ml 标准品：取 100ul 10,000pg/ml 的标准品加入有 900ul 样品稀释液的 Eppendorf 管中，混匀，做上标记。
3. 配制 500pg/ml \rightarrow 15.6pg/ml 标准品：准备 6 只 Eppendorf 管，每管加 300ul 样品稀释液，分别标记上 500pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 62.5pg/ml, 31.3pg/ml, 15.6pg/ml。取 300ul 1000pg/ml 的标准品加入标记 500pg/ml 的管中，混匀后同样取出 300ul，加入下一只管中。余同此类推，直到最后一只样品管。

注意：(1) 根据标本 TNF α 的含量，用户同样可以检测范围 500pg/ml \rightarrow 7.8pg/ml，将 15.6pg/ml 的标准品进一步等倍稀释即可。

(2) 已经稀释的标准品 (10,000pg/ml)，应在 12 小时内使用。-20 $^{\circ}$ C 冷冻保存条件下，2 天内可以使用,但不得反复冻融。

B. HRP 连接抗小鼠 TNF α 抗体提前拿出平衡至室温。

操作程序

所有工作液在加入酶标板孔前都应平衡至室温。试剂或样品稀释时，切不可忘记混匀。每次检测都应该做标准曲线。用户须估计样品待测因子的含量，决定适当的稀释倍数。

1. 确定本次检测所需的已包被抗体的酶标板孔数目，并增加 1 孔作为 TMB 空白显色孔。总数=样品数+9；做双份检测时 \times 2。其余重包装好放入冰箱中。
2. 每孔分别加入 50ul 1000pg/ml, 500pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 62.5pg/ml, 31.3pg/ml, 15.6pg/ml, 0pg/ml (样品稀释液) 的标准品，准备好的样本 50ul。再将 HRP 连接抗小鼠 TNF α 抗体按每孔 50ul 依次加入 (TMB 空白显色孔除外)。
3. 酶标板加上封板膜，室温振荡孵育 60 分钟，速度 500 rpm，振幅 3mm。
4. 1 \times TBS-T 洗涤缓冲液洗涤 4 次，每次浸泡 90 秒 (每孔洗液至少 300ul)。
5. 按每孔 90ul 依次加入已平衡至室温的 TMB 显色液，室温避光反应 15-20 分钟 (注意：显色时间供参考，因用户实验室条件差异，最佳显色时间会有所不同。此时肉眼可见标准品的前 3-4 孔有明显的梯度蓝色，后 3-4 孔差别不明显)。
6. 按每孔 100ul 依次加入终止液，此时蓝色立转黄色。
7. 用酶标仪在 450nm 测定 O.D.值。

有两种设定空白对照的方案：

(1) 将 TMB 空白显色孔(只加 TMB 显色液和终止液)设为对照。所有的标准品和样品的吸光值减去 TMB 空白显色孔的吸光值后，在坐标纸上画出曲线，以吸光值作为纵坐标，以浓度作为横坐标。

(2) 将零孔设为对照。所有的标准品和样品的吸光值减去零孔的吸光值后，得到的数据可以直接在坐标纸上画出曲线。

8. 根据样品的吸光值在坐标上找出对应的浓度。用户也可以使用各种应用软件来计算。应记住由于样品稀释了 N 倍，其实际浓度应该 \times N。



操作程序总结:

1. 加样品和标准品, HRP 连接抗体室温振荡反应 60 分钟, 速度 500 rpm, 振幅 3mm。
2. 1×TBS-T 洗涤缓冲液洗涤 4 次。
3. 加 TMB 室温反应 15-20 分钟。
4. 加入终止液, 读数。

典型数据

(数据供参考, 不同用户最佳显色时间会有所不同)

浓度	0.0pg/ml	15.6pg/ml	31.3pg/ml	62.5pg/ml	125pg/ml	250pg/ml	500pg/ml	1000pg/ml
O.D.	0.053	0.143	0.205	0.333	0.572	1.024	1.738	2.539