

## Mouse sTNF R I ELISA Kit

### 小鼠肿瘤坏死因子可溶性受体 I ELISA 试剂盒

产品编号: EK0529

规格: 96T

检测范围: 15.6pg/ml→1000pg/ml。

敏感性: <1pg/ml

特异性: 系统和其它细胞因子无交叉反应。

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、细胞裂解液、细胞培养上清。

#### 工作原理

Soluble tumor necrosis factor receptor I, sTNF R I, 肿瘤坏死因子可溶性受体 I。细胞表面有两种类型的肿瘤坏死因子受体, TNFR-p60,type B; TNFR-p80,type A。它们能够中和 TNF  $\alpha$  和 TNF  $\beta$  的生物活性。sTNF R I 和 sTNF R II 分别从 TNFR-p60、TNFR-p80 的细胞表面部分脱落。所有细胞都表达 sTNF R I, sTNF R II 的表达主要集中在造血干细胞和免疫系统。sTNF R I 中和 TNF  $\alpha$  的作用比中和 TNF  $\beta$  至少高十倍。本试剂盒所用标准品为重组小鼠 sTNF R I, 表达从 22-211 位的氨基酸, 分子量为 21KDa。

博士德所提供的 sTNF R I ELISA Kit 是典型的夹心法酶联免疫吸附测定试剂盒 (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay, ELISA)。预先包被的抗体和检测相抗体为近 100%纯度的亲和纯化多克隆抗体。检测相抗体经生物素 (biotin) 标记。样品和生物素标记抗体先后加入酶标板孔反应后, PBS 或 TBS 洗涤。随后加入过氧化物酶标记的亲和素反应; 经过 PBS 或 TBS 的彻底洗涤后用底物 TMB 显色。TMB 在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 R 呈正相关。

#### 试剂盒中内容 (96 孔)

| 内容                        | 规格     | 数量  |
|---------------------------|--------|-----|
| 预包被抗小鼠 sTNF R I 抗体的 96 孔板 | 96T    | 1 板 |
| 重组小鼠 sTNF R I 冻干标准品       | 10ng/管 | 2 管 |
| 生物素标记抗小鼠 sTNF R I (100X)  | 100ul  | 1 管 |
| 亲和素-过氧化物酶复合物 (ABC) (100X) | 100ul  | 1 管 |
| 样品稀释液                     | 30ml   | 1 瓶 |
| 抗体稀释液                     | 12ml   | 1 瓶 |
| ABC 稀释液                   | 12ml   | 1 瓶 |
| TMB 显色液                   | 10ml   | 1 瓶 |
| 终止液                       | 10ml   | 1 瓶 |
| 洗涤缓冲液(25X)                | 20ml   | 1 瓶 |
| 封板膜                       |        | 4 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. 恒温箱
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 25X 洗涤缓冲液稀释 25 倍，成 1X 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 1X 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℃冷冻保存。

血清——用干净试管收集血液，室温凝固 30 分钟，离心 1000×g 15 分钟，收集血清。立即分析或分装后-20℃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—14000g 离心 3-5 分钟，取上清。立即分析或分装后-20℃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 5-50ng/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 0.5-5ng/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 7.8-500pg/ml。一般按 1: 2 稀释。120ul 样品稀释液加 120ul 样品。

特低——指待测因子≤7.8pg/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. sTNF R I 标准品的稀释和使用。

试剂盒提供 2 管标准品，每管 10ng，每次使用 1 管。

1. 配制 10,000pg/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 500pg/ml 标准品：取 0.05ml 10,000pg/ml 的标准品加入有 0.95ml 样品稀释液的 Eppendorf 管中，混匀，做上标记。
3. 配制 250pg/ml→7.8pg/ml 标准品：准备 6 只 Eppendorf 管，每管加 0.3ml 样品稀释液，分别标记上 250pg/ml, 125pg/ml, 62.5pg/ml, 31.3pg/ml, 15.6pg/ml, 7.8pg/ml。取 0.3ml 500pg/ml 的标准品加入标记 250pg/ml 的管中，混匀后同样取出 0.3ml，加入下一只管中。余同此类推，直到最后一只样品管。

**注意：**已经稀释的标准品（10,000pg/ml），应在 12 小时内使用。-20℃冷冻保存条件下，2 天内可以使用，但不得反复冻融。

B. 生物素标记抗小鼠 sTNF R I 抗体工作液：在使用前 2 小时内准备。

1. 根据每孔需要 100ul 计算总的用量（实际配制时应多配制 100-200ul）。
2. 按 1ul 生物素标记抗小鼠 sTNF R I 加抗体稀释液 99ul 的比例配制工作液。轻轻混匀。

C. 亲和素-过氧化物酶复合物（ABC）工作液的准备：在使用前 1 小时内准备。

1. 根据每孔需要 100ul 计算总的用量（实配时应多配制 100-200ul）。
2. 按 1ul 亲和素-过氧化物酶复合物（ABC）加 ABC 稀释液 99ul 的比例配制工作液。轻轻混匀。

## 操作程序

已稀释好的 ABC 和 TMB 显色液在加入酶标板孔前都应预先在 37℃中平衡至少 30 分钟。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×2。其余重包装好放入冰箱中。
2. 将 500pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 62.5pg/ml, 31.3pg/ml, 15.6pg/ml, 7.8pg/ml 的标准品各 100ul 依次加入一排 7 孔中，1 孔只加样品稀释液的作为零孔。对于小鼠血清、细胞裂解液、细胞培养上清，直接加已用样品稀释液稀释的样品 100ul。
3. 酶标板加上封板膜，37℃反应 90 分钟。
4. 反应后用自动洗板机吸去酶标板内的液体（将自动洗板机的洗涤次数设为零再开始即可）；或甩去酶标板内液体，再对着吸水纸拍几下。**不洗**。
5. 将准备好的生物素抗小鼠 sTNF R I 抗体工作液按每孔 100ul 依次加入（TMB 空白显色孔除外）。酶标板加上封板膜，37℃反应 60 分钟。
6. 1X 洗涤缓冲液洗涤 3 次，每次浸泡 1 分钟左右（每孔洗液至少 300ul）。
7. 将准备好的 ABC 工作液按每孔 100ul 依次加入（TMB 空白显色孔除外）。酶标板加上封板膜，37℃反应 30 分钟。

8. 1X 洗涤缓冲液洗涤 5 次，每次浸泡 1-2 分钟左右（每孔洗液至少 300ul）
9. 按每孔 90ul 依次加入 TMB 显色液，37℃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）。
10. 按每孔 100ul 依次加入终止液，此时蓝色立转黄色。
11. 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。
12. 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，37℃反应 90 分钟。不洗。
2. 加生物素标记抗体，37℃反应 60 分钟。1X 洗涤缓冲液洗涤 3 次。
3. 加 ABC，37℃反应 30 分钟。1X 洗涤缓冲液洗涤 5 次。
4. TMB37℃反应 15-20 分钟。
5. 加入终止液，读数。

#### 典型数据

TMB37℃反应 15 分钟。

（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. | 0.006    | 0.077     | 0.137     | 0.252     | 0.471    | 0.834    | 1.444    | 2.185     |

#### 参考文献

1. MacEwan DJ. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. Cell Signal. 2002 Jun;14(6):477-92. Review.
2. Micheau O and Tschoop J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. Cell 2003, 114 (2), 181-190.
3. Baillie J, Sahlender DA and Sinclair JH. Mouse cytomegalovirus infection inhibits tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) signaling by targeting the 55-kilodalton TNF-alpha receptor. J. Virol. 2003, 77 (12), 7007-7016.
4. Muc-Wierzon M, Nowakowska-Zajdel E, Zubelewicz B, Wierzon J, Kokot T, Klakla K, Szkilnik R, Wiczowski A. Circadian fluctuations of melatonin, tumor necrosis factor-alpha and its soluble receptors in the circulation of patients with advanced gastrointestinal cancer. J Exp Clin Cancer Res. 2003 Jun;22(2):171-8.