



Mouse TNF Alpha EZ-SET ELISA Kit

DIY Antibody Pairs

产品编号: EZ0527

规格: 96T×5

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。

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 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)。检测抗体经生物素 (biotin) 标记。样品和生物素标记抗体先后加入已经包被抗体的酶标板孔反应后, PBS 或 TBS 洗涤。随后加入过氧化物酶标记的亲合素反应; 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小鼠 TNF α 呈正相关。

试剂盒中内容

内容	规格	数量
重组小鼠 TNF α 冻干标准品	10ng/管	3 管
抗小鼠 TNF α 包被抗体(100X)	500ul	1 管
生物素标记抗小鼠 TNF α (100X)	500ul	1 管
亲和素-过氧化物酶复合物 (ABC) (100X)	500ul	1 管

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. 酶标板 (Cat# AR1100)。
7. 封板膜。
8. 包被抗体稀释液: PBS。
9. 蛋白样品稀释液, 检测抗体稀释液, 封闭液: 1% BSA in PBS, pH 7.2-7.4。
10. TMB 显色液 (Cat# AR1104)。



11. 终止液 (Cat# AR1105)。
12. 洗涤缓冲液(PBS and PBS-T)
PBS: 8g NaCl, 0.2g KCl, 1.15g Na₂HPO₄, 0.2g KH₂PO₄, 溶于 800ml 的蒸馏水中, 混匀后定容至 1L, 调节 pH 值为 7.2-7.4。PBS-T: 0.1% Tween® 20 in PBS, 调节 pH 值为 7.2-7.4。
试剂 6-12 在 EZA001 试剂盒中都有提供

注意事项

1. 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。
2. 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。
3. 为免交叉污染, 要避免重复使用手中的吸头和试管。
4. 禁止混用不同批次试剂盒内的试剂。
5. 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。

酶标板的准备

使用前将所有试剂置于室温, 工作稀释剂准备好并立即使用。

1. 确定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。
2. 包被抗小鼠 TNF α 抗体工作液: 根据每孔需要 100ul 计算总的用量 (实际配制时应多配制 100-200ul)。按 1ul 包被抗小鼠 TNF α 抗体加 PBS 99ul 的比例配制工作液。轻轻混匀。将准备好的包被抗体工作液按每孔 100ul 依次加入酶标板中, 加上封板膜, 在 4 °C 下孵育过夜。
3. 吸去板内液体, 按每孔 200ul 依次加入封闭液, 室温封闭 2 小时。
4. 1X 洗涤缓冲液洗涤 3 次, 每次浸泡 5s。
5. 吸去板内液体, 即可进行后续实验。

试剂的准备和保存

A. 小鼠 TNF α 标准品的稀释和使用: 在使用前 2 小时内准备。

试剂盒提供 3 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 1000pg/ml 标准品: 取 100ul 10,000pg/ml 的标准品加入有 0.9ml 样品稀释液的 Eppendorf 管中, 混匀, 做上标记。
3. 配制 500pg/ml→15.6pg/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 500pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 62.5pg/ml, 31.3pg/ml, 15.6pg/ml。取 0.3ml 1000pg/ml 的标准品加入标记 500pg/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 TNF α 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 TNF α 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

1. 确定本次检测所需的已包被抗体的酶标板孔数目，取出后其余重新包装好放入冰箱中。
2. 将 1000pg/ml，500pg/ml，250pg/ml，125pg/ml，62.5pg/ml，31.3pg/ml，15.6pg/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、血浆、细胞裂解液或细胞培养上清，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 TNF α 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 PBS 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 PBS-T 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。

结果分析

- a. 所有的标准品和样品的吸光值减去 TMB 空白显色孔或者零孔的吸光值。
- b. 以标准品浓度作为横坐标，吸光值作为纵坐标，手工绘制或用软件绘图并选取最佳拟合曲线，推荐使用四参数方程拟合。ELISA 绘图软件可以在博士德公司官网技术支持下载。
- c. 根据样品的吸光值在坐标上找出对应的浓度。若标本 OD 值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测，应记住由于样品稀释了 N 倍，其实际浓度应该 $\times N$ 。



典型数据

TMB37°C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/m	15.6pg/m	31.3pg/m	62.5pg/m	125pg/m	250pg/m	500pg/m	1000pg/m
O.D.	0.022	0.139	0.208	0.382	0.714	1.230	1.891	2.276