



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

有效期: 6个月(4℃)。

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×TBS-T 洗涤缓冲液稀释 25 倍, 成 1×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×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℃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×g 20 分钟，收集血清。立即分析或分装后-20℃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℃离心 2000×g 20 分钟。为消除血小板的影响，建议在 2-8℃进一步离心 10000×g 10 分钟。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—14000×g 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 10-100ng/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 1-10ng/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 15.6-1000pg/ml。按 1: 2 稀释。120ul 样品稀释液加 120ul 样品。

特低——指待测因子≤15.6pg/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→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→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℃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×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×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×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 |