Mouse TNF Alpha ELISA Kit

小鼠肿瘤坏死因子 Alpha ELISA 试剂盒

产品编号： HSEK0527
规格： 96T
检测范围： 1.56pg/ml→100pg/ml
灵敏度： 0.006pg/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、血浆、细胞培养上清或细胞裂解液。

工作原理

Tumor necrosis factor Alpha，TNF Alpha，肿瘤坏死因子 Alpha。TNF Alpha 前体是以跨膜蛋白的形式存在于细胞内，在细胞外被剪切成 17KDa 的成熟形态（157 个氨基酸）。活性的 TNF Alpha 以非共价键二聚体、三聚体甚至五聚体的形式存在，但在 SDS-PAGE 显示为单一 17KDa 条带。很多细胞都能合成 TNF Alpha，包括各种免疫细胞（单核细胞、巨噬细胞、T、B 细胞、粒细胞、NK 细胞）和非免疫细胞（上皮细胞、纤维细胞、肌细胞、Kuppfer 细胞等）。TNF Alpha 的合成受到很多因素的影响。其生理功能最早认为是有抗肿瘤活性，现在已明确不仅能调节肿瘤细胞的生长，对很多细胞的生长、分化和代谢都有影响。TNF Alpha 是免疫宿主反应的快速反应因子。其另一特点是在免疫疾病中有病理性作用。

博士德所提供的 TNF Alpha 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）。预先包被的抗体为单克隆抗体。检测相抗体为多克隆抗体，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 TNFAlpha 呈正相关。

试剂盒中内容(96 孔)

内容	规格	数量
预包被抗小鼠 TNFAlpha 抗体的 96 孔板	96T	1 板
重组小鼠 TNFAlpha 冻干标准品	10ng/管	2 管
生物素标记抗小鼠 TNFAlpha(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. 微孔板恒温振荡器
5. 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。
6. 干净的试管和 Eppendof 管。
7. 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。

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。

血浆——采用肝素、EDTA 抗凝，抽血后 30 分钟内离心 1000×g 15 分钟。立即分析或分装后-20℃冷冻保存。

细胞培养上清——1000×g 离心 5 分钟去除沉淀，收集上清。

细胞裂解液——收集的细胞用预冷的 PBS 洗涤 3 次。每 100 万个细胞中加入 100-200 μL 细胞裂解液(推荐使用 NP-40 裂解液，可以在裂解液中加入蛋白酶抑制剂)，用移液枪吹打均匀，冰上裂解 10 分钟，充分裂解后，10000—14000g 离心 3-5 分钟，取上清。

建议健康血清血浆样本两倍稀释检测，100ul 样品稀释液加 100ul 样品。

试剂的准备和保存

A. TNFAlpha 标准品的稀释和使用：在使用前 2 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 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 100pg/ml 标准品：取 10ul 10,000pg/ml 的标准品加入有 0.99ml 样品稀释液的 Eppendorf 管中，混匀，做上标记。
3. 配制 50pg/ml→1.56pg/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 50pg/ml，25pg/ml，12.5pg/ml，6.25pg/ml，3.13pg/ml，1.56pg/ml。取 0.3ml 100pg/ml 的标准品加入标记 50pg/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 TNFAlpha 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 TNFAlpha 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

TMB 显色液在加入酶标板孔前应预先在 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 100pg/ml ，50pg/ml，25pg/ml，12.5pg/ml，6.25pg/ml，3.13pg/ml，1.56pg/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、细胞培养上清或细胞裂解液，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，室温振荡反应 90 分钟。
4. 反应后用自动洗板机吸去酶标板内的液体；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 TNFAlpha 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，室温振荡反应 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，室温振荡反应 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 依次加入已在 37℃平衡 30 分钟的 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，顺序同加 TMB。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×N。**

操作程序总结：

1. 加样品和标准品，室温振荡反应 90 分钟。不洗。
2. 加生物素标记抗体，室温振荡反应分钟。1X 洗涤缓冲液洗涤 3 次。
3. 加 ABC，室温振荡反应 30 分钟。1X 洗涤缓冲液洗涤 5 次。
4. TMB37℃反应 25-30 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	1.56pg/ml	3.13pg/ml	6.25pg/ml	12.5pg/ml	25pg/ml	50pg/ml	100pg/ml
O.D.	0.074	0.156	0.215	0.349	0.618	1.026	1.676	2.338