

## Mouse TNF Alpha High Sensitivity ELISA Kit

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、Kupffer 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 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 Eppendorf 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  $\times N$ 。

### 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°C 反应 25-30 分钟。
5. 加入终止液，读数。

### 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/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