

M5 HiPer Mouse TNF- α ELISA Kit 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 HiPer Mouse TNF- α ELISA Kit	48T	MF821-01
M5 HiPer Mouse TNF- α ELISA Kit	96T	MF821-02

【储存条件】

4°C保存。

【产品简介】

TNF- α 是一种主要由单核细胞和巨噬细胞产生的单核因子。1975 年, Carswell 等人发现卡介苗攻击小鼠后再用内毒素处理, 小鼠血清中出现一种能诱导肿瘤组织出血坏死的物质, 故命名为肿瘤坏死因子。1985 年 Shalaby 把巨噬细胞产生的 TNF 命名为 TNF- α , 把 T 淋巴细胞产生的淋巴毒素命名为 TNF- β 。

小鼠的 TNF- α 基因长约 2.78kb, 由 4 个外显子和 3 个内含子组成。小鼠 TNF- α 前体含 235 个氨基酸残基, 信号肽为 79 氨基酸残基(1)。成熟的小鼠 TNF- α 分子量为 17kDa, 由 156 个氨基酸残基组成, 第 69 位和 100 位两个半胱氨酸形成分子内二硫键, 有一个糖基化点, 但糖基化不影响其生物学功能。鼠与人的 TNF- α 有 79% 氨基酸组成同源性, TNF- α 的生物学作用无明显的种属特异性。小鼠的 TNF- α 是由活化的巨噬细胞及其它类型的细胞, 包括 T 细胞和 B 细胞, NK 细胞, LAK 细胞, 星形胶质细胞, 内皮细胞, 平滑肌细胞和某些肿瘤细胞(2-5)产生。

本实验采用双抗体夹心 ELISA。用抗小鼠 TNF- α 单克隆抗体预包被酶标板, 加入适度稀释的样本和标准品, 其中的 TNF- α 会与其单抗结合, 洗去游离成分; 加入生物素化的抗小鼠 TNF- α 抗体, 抗小鼠 TNF- α 抗体与结合在单抗上的小鼠 TNF- α 结合而形成免疫复合物, 洗去游离的成分; 加入辣根过氧化物酶标记的亲合素, 生物素与亲合素特异性结合, 洗去未结合的酶结合物; 加入显色剂, 若反应孔中有 TNF- α , 辣根过氧化物酶会使无色的显色剂现蓝色; 加终止液变黄。在 450nm 下测 OD 值, TNF- α 浓度与 OD450 值之间呈正比, 可通过绘制标准曲线计算出标本中 TNF- α 浓度。

【产品组份】

货号及规格	MF821-01(48 Tests)	MF821-02(96 Tests)	保存条件
1a 标准品	1 支(冻干)	2 支(冻干)	4°C
1b 标准品和标本稀释液	1 瓶	1 瓶	4°C
2a 浓缩生物素化抗体 100x	1 支	2 支	4°C
2b 生物素化抗体稀释液	1 瓶	1 瓶	4°C
3a 浓缩酶结合物 100x	1 支	2 支	4°C(避光)
3b 酶结合物稀释液	1 瓶	1 瓶	4°C
4 浓缩洗涤液 20x	1 瓶	1 瓶	4°C
显色剂	1 瓶	1 瓶	4°C(避光)
终止液	1 瓶	1 瓶	4°C
抗体包被板条	8x6	8x12	4°C
封板胶纸	2 张	4 张	4°C
说明书	1 份	1 份	

【注意事项】

1. 试剂盒使用前请保存在 2-8°C。除复溶后的标准品, 其他成分不可冻结。
2. 浓缩生物素化抗体, 浓缩酶结合物体积小, 运输中颠簸和可能的倒置, 会使液体沾到管壁或瓶盖。因此使用前请用手甩几下或 1000 rpm 离心 1 分钟, 以使附着管壁或瓶盖的液体沉积到管底。
3. 从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶, 属于正常现象, 微加热至 40°C 使结晶完全溶解后再配制洗涤液。
4. 若需要分次使用标准品, 在标准品复溶后应按每一次用量分装, 将其放在 -20 或 -70°C 贮存。避免反复冻融。
5. 使用干净的塑料容器配制洗涤液, 使用前充分混匀试剂盒里的各种成份及样品。

6. 洗涤酶标板时应充分拍干，不要将吸水纸直接放入酶标反应孔中吸水。
7. 不要用其它来源的试剂混合或替代该产品的组分，不同批号的试剂盒组份不能混用，请在有效日期内使用本产品。
8. 在试验中标准品和样本检测时建议作双复孔或三复孔，加入试剂的顺序应一致，以保证所有反应孔孵育的时间一样。
9. 充分混匀对反应结果尤为重要，最好使用微量振荡器(使用最低频率进行振荡)。
10. 避免操作过程中酶标板干燥，干燥会使酶标板上生物成分迅速失活，影响实验结果。
11. 适当的稀释样品，使样品值落在标准曲线范围内，根据待测因子含量高、中、低的不同，建议采用 1:100、1:10、1:2 稀释样品。
12. 如果样品 OD 值高于最高标准，适当增加稀释度并重复检测。
13. 标准品稀释液，操作人，移液方式，洗涤方法，孵育时间及温度，试剂盒批次的不同均可能会导致结果的差异。
14. 此法可有效的消除可溶性受体、结合蛋白以及生物样品中的其他因素的干扰。

【标本收集】

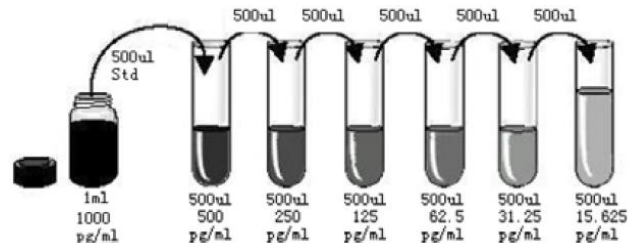
1. 血清：使用不含热原和内毒素的试管，收集血液后，室温凝血 30min，1000×g 离心 10min，小心分离血清。
2. 血浆：用 EDTA、柠檬酸盐、肝素作为抗凝剂收集血浆，收集后 30min 内以 1000×g 离心 15min 去除颗粒。
3. 细胞上清液：1000×g 离心 10min 去除颗粒和聚合物。
4. 保存：若样品不立即检测，请将其按一次用量分装，-20℃~-70℃保存，避免反复冻融。尽量避免使用溶血或高血脂样本。如果血清中含有大量颗粒，检测前先离心或过滤去除；室温下解冻，请勿于 37℃或更高的温度加热解冻。
5. 稀释：根据实际情况，将标本做适当倍数稀释(建议做预实验，以确定稀释倍数)。

【操作步骤】

一、检测前准备工作

1. 请提前 30 分钟从冰箱中取出试剂盒，平衡至室温。
2. 洗涤缓冲液：从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶，这属于正常现象，加热并轻轻摇晃使结晶完全溶解后再配制。将浓缩洗涤液用双蒸水稀释(1:20)。未用完的放回 4℃。
3. 标准品：加入标准品/标本稀释液(1b)1.0ml 至冻干标准品(1a)中，待彻底溶解后，静置 15 分钟混匀(浓度为 1000pg/ml)，然后根据需要稀释，(建议标准曲线使用以下浓度：1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625、0 pg/ml)。注：稀释的标准品不得重复使用，未用完的标准品应按照一次用量分装后，将其放在-20~-70℃贮存，一次性使用，避免反复冻融。
4. 生物素化抗体工作液：根据每孔需要 100μl 来计算总的用量，多配制 100-200μl。以生物素化抗体稀释液(2b)稀释浓缩生物素化抗体(2a)(1:100)。最好现用现配。
5. 酶结合物工作液：以酶结合物稀释液(3b) 稀释浓缩酶结合物(3a)(1:100)。最好现用现配。

标准品稀释方法图例

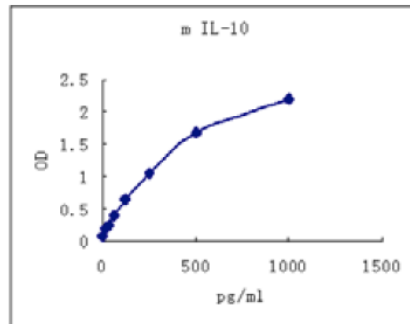


二. 具体操作步骤

- 按照上述准备工作配制好各种溶液。
- 根据待测样品数量和标准品的数量决定所需的板条数，并增加 1 孔作为空白对照孔。分别将标本和不同浓度标准品(100 μ l /孔)加入相应孔中（零孔只加标准品/样本稀释液），用封板胶纸封住反应孔，37 $^{\circ}$ C孵箱孵育 90 分钟（空白对照孔除外）。
- 洗板 4 次：(1)自动洗板机：要求注入的洗涤液为 350 μ l，注入与吸出间隔 15-30 秒。(2)手工洗板：甩尽孔内液体，每孔加洗涤液 350 μ l，静置 30 秒后甩尽液体，在厚迭吸水纸上拍干。
- 加入生物素化抗体工作液(100 μ l /孔)。用封板胶纸封住反应孔，37 $^{\circ}$ C孵箱孵育 60 分钟（空白对照孔除外）。
- 洗板 4 次。
- 加入酶结合物工作液(100 μ l /孔)。用封板胶纸封住反应孔，37 $^{\circ}$ C孵箱孵育 30 分钟（空白对照孔除外）。
- 洗板 4 次。
- 加入显色剂 100 μ l /孔，避光，37 $^{\circ}$ C孵箱孵育 10-20 分钟。
- 加入终止液 100 μ l /孔，混匀后即刻测量 OD450 值(5 分钟内)。

三. 结果判读

- 每个标准品和标本的 OD 值应减去零孔的 OD 值。（若不减零孔值，标准曲线的零孔应相交于 Y 轴）
- 使用计算机软件以标准品浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，生成相应的标准曲线。通过标本的 OD 值可在标准曲线上换算出其浓度。
- 若 OD 值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测，计算浓度时应乘以稀释倍数。



【灵敏度，特异性和重复性】

1. 灵敏度：最低检测小鼠 TNF- α 剂量小于 3.9pg/ml。
2. 特异性：不与 IL-1 α , 1 β , 2, 3, 5, 6, 7, 9, G-CSF, GM-CSF, C10, INF-r, LIF, M-CSF, SCF, VEGF, TNF- β 等反应。
3. 重复性：板内、板间变异系数均<10%

**【备注】**

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。