



INSTRUCTION MANUAL



FOR RESEARCH USE ONLY; NOT FOR THERAPEUTIC OR DIAGNOSTIC APPLICATIONS!

PLEASE READ THROUGH ENTIRE procedure BEFORE BEGINNING!

<http://zcibio.com>

小鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α) ELISA 定量检测试剂盒 (ELISA) 说明书

【产品名称】

通用名称：小鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 定量检测试剂盒 (ELISA)

英文名称：Mouse Tumor necrosis factor α (TNF- α) ELISA kit

货号：ZC-M6765

【包装规格】

96 人份/盒

【预期用途】

仅供科研使用，定量检测血清、血浆、细胞培养上清液中小鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的浓度。

【检验原理】

本试剂盒采用双抗体夹心酶联免疫吸附检测技术。特异性抗小鼠 TNF- α 单克隆抗体预包被在高亲和力的酶标板上。酶标板孔中加入标准品、待测样本和生物素化的检测抗体，经过孵育，样本中存在的 TNF- α 与固相抗体和检测抗体结合。洗涤去除未结合的物质后，加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(streptavidin-HRP)。洗涤后，加入显色底物 TMB，避光显色。颜色反应的深浅与样本中 TNF- α 的浓度成正比。加入终止液终止反应，在 450 nm 波长测定吸光度值。

主要成分

组分	规格	数量
包被微孔板	96T	1 板
标准品	4000pg/mL	2 管
检测抗体	70uL	1 管
辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素	140uL	1 管
10×检测缓冲液	5mL	1 瓶
标准品稀释液	5mL	1 瓶
TMB 显色液	11mL	1 瓶
TMB 终止液	11mL	1 瓶
洗涤缓冲液 (20X)	30ml	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

需要但未提供的材料及耗材

- 1、酶标仪
- 2、精密移液器及一次性吸头
- 3、蒸馏水
- 4、洗瓶或者自动洗板机
- 5、37℃水浴锅或恒温箱
- 6、500ml 量筒
- 7、无粉一次性乳胶手套

【储存条件及有效期】

- 1、2-8℃保存，切勿冷冻，有效期 6 个月。
- 2、开封使用后，包被微孔板放入带有干燥剂的自封袋中，密闭自封袋，并将全部试剂放回 2-8℃冰箱。

【适用仪器】

半自动的酶标仪，如 Thermo MK3，或者国产酶标仪。

【样本要求】

样本类型和采集

细胞培养上清

300 g 离心 10 分钟去除沉淀物，即刻检测，或者分装，-20℃以下贮存。

血清样本

分离管分离血清。在 1000 g 离心之前，使血样凝集 30 分钟。吸取血清样本之后即刻检测，或者分装，-20℃以下贮存。

血浆样本

EDTA、枸橼酸钠或肝素抗凝收集血浆样本。1000 g 离心 30 分钟收集样本。即刻检测，或者分装，-20℃以下贮存。本试剂盒可能适用于其它生物学样本。

细胞培养上清、血清和血浆已经过验证。

注意：检测前，样本中可见的沉淀必须去除。不要使用严重溶血或高血脂的样本。样本应分装并贮存于-20℃，以避免小鼠 TNF- α 活性的丢失。如果在 24 小时内检测，样本可以存放在 2-8℃。避免样本的反复冻融。在检测前，冷冻样本应该缓慢地恢复至室温，轻柔地混匀。

样本保存和稳定性

样本在 2-8℃条件下，可以储存 72h，或者在-20℃储存 6 个月。样本收集后，不是一次检测完，请按一次用量分装冻存，避免反复冻融，使用时在室温下解冻，确保样品均匀充分解冻。

【检验方法】

试剂准备

检测前请将所有的试剂、样本恢复至室温。如果浓缩的试剂出现结晶，37℃温浴，直至结晶全部溶解。

1×洗液

吸取 20×浓缩洗液 30 ml 至 1 L 的量筒，加蒸馏水或去离子水至 600 ml，轻轻混匀，避免泡沫。转移至干净瓶内。2-25℃贮存，1×洗液可稳定 30 天。

1×检测缓冲液

吸取 10×浓缩检测缓冲液 5 ml 至 100 ml 量筒，加蒸馏水或去离子水至 50 ml，轻轻混匀，避免泡沫。2-8℃贮存，1×检测缓冲液可稳定保存 30 天。

检测抗体

稀释前充分混匀。根据标准品和待测样本的数量，用 1×检测缓冲液按 1:100 稀释浓缩的检测抗体。注意：请在 30 分钟内使用稀释后的检测抗体。

辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素

稀释前充分混匀。根据标准品和待测样本的数量，用 1×检测缓冲液按 1: 100 稀释浓缩的辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素。注意：请在 30 分钟内使用稀释后的辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素。

样本稀释

如果样本需要稀释，请用试剂盒提供的 1×检测缓冲液稀释血清/血浆样本，用细胞培养基稀释细胞培养上清。

小鼠 TNF- α 标准品

用蒸馏水或去离子水重溶小鼠 TNF- α 标准品，重溶体积标注在小鼠 TNF- α 标准品的标签上（2000pg 冻干品注入 500 μ l 标准品稀释液）。轻柔地涡旋震荡，确保充分混匀，重溶后标准品的浓度为 4000 pg/ml。重溶后静置 10 - 30 分钟。稀释前充分混匀。请使用聚丙烯管进行标准品稀释。

血清/血浆样本标准曲线的制作：

取 230 μ l 浓缩的小鼠 TNF- α 标准品，加入 230 μ l 标准品稀释液，作为标准曲线的最高浓度（2000pg/ml）。在每一个试管中加入 230 μ l 标准品稀释液。使用高浓度标准品做 1: 1 系列稀释。每次移液时，请确保充分混匀。以标准品稀释液作为标准曲线的零浓度。

（标准品浓度：2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 0pg/mL）

细胞培养上清样本标准曲线的制作：

取 230 μ l 浓缩的小鼠 TNF- α 标准品，加入 230 μ l 细胞培养基，作为标准曲线的最高浓度（2000pg/ml）。在每一个试管中加入 230 μ l 细胞培养基。使用高浓度标准品做 1: 1 系列稀释。每次移液时，确保充分混匀。以细胞培养基作为标准曲线的零浓度。

（标准品浓度：2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 0pg/mL）

【检测步骤】

检测之前请将所有的试剂、样本平衡至室温。

1. 准备好所有需要的试剂及工作浓度标准品。
2. 将不需要的板条拆卸下来，放回装有干燥剂的铝箔袋，重新封好封口。
3. 加入 300 μ l 1×洗液静置浸泡 30 秒。为了获得理想的实验结果浸泡是必须的。弃掉洗液之后，在吸水纸上将微孔板拍干。洗板完成之后，请立即使用微孔板，不要让微孔板干燥。

4. **加标准品：**标准品孔加入 100 μ l 2 倍倍比稀释的标准品。空白孔加入 100 μ l 标准品稀释液（血清/血浆样本）或培养基（细胞培养上清样本）。

5. **加样本：血清/血浆：**样本孔加入 90 μ l 1 \times 检测缓冲液和 10 μ l 样本。

细胞培养上清：样本孔加入 100 μ l 细胞培养上清。

6. **加检测抗体：**每孔加入 50 μ l 稀释的检测抗体（1:100 稀释）。保证步骤 4、5、6 连续加样，不要间断。加样过程在 15 分钟内完成。

7. **孵育：**使用封板膜封板。300 转/分钟振荡，室温孵育 1.5 小时。

8. **洗涤：**弃掉液体，每孔加入 300 μ l 洗液洗板，洗涤 6 次。每次洗板，在吸水纸上拍干。为获得理想的实验性能，必须彻底移除残留液体。

9. **加酶孵育：**每孔加入 100 μ l 稀释的辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素（1:100 稀释）。

10. **孵育：**使用新的封板膜封板。300 转/分钟振荡，室温孵育 30 分钟。

11. **洗涤：**重复步骤 8。

12. **加底物显色：**每孔加入 100 μ l 显色底物 TMB，避室温孵育 5 - 30 分钟。

13. **加终止液：**每孔加入 100 μ l 终止液。颜色由蓝色变为黄色。如果颜色呈现绿色或者颜色的变化明显不均匀，请轻轻叩击板框，充分混匀。

14. **检测读数：**在 30 分钟之内，使用酶标仪进行双波长检测，测定 450 nm 最大吸收波长和 570 nm 或 630 nm 参考波长下的 OD 值。校准后的 OD 值为 450 nm 的测定值减去 570 nm 或 630 nm 的测定值。仅使用 450 nm 测定会导致 OD 值偏高，并且准确度降低。

【结果计算】

计算标准品和样本的平均 OD 值，然后减去零浓度标准品的 OD 值。以标准品浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，用计算机软件进行回归拟合生成标准曲线。回归分析确定最佳拟合曲线。通过对浓度值和 OD 值取对数拟合，可以对标准曲线进行线性化。此过程可能可以得到更多样本的浓度，但数据的准确度会降低一些。

注意：标准曲线最高浓度点的终浓度为 2000 pg/ml。如果完全按照说明书的步骤操作（10 μ l 样本 + 90 μ l 检测缓冲液），计算样本浓度时请乘以稀释因子 10。如果样本进行了其它方式的稀释，计算样本浓度时请乘以相应的稀释倍数。

【检验方法的局限性】

仅供科研使用，不得用于临床诊断。

-
- 1、仅供科研使用，不得用于临床诊断。
 - 2、在试剂盒标示的有效期内使用，过期产品不得使用。
 - 3、跟其他厂家的试剂盒或者组分不能混用。
 - 4、使用试剂盒配套的样品稀释液。
 - 5、如果样本值高于最高标准品浓度值，请将样本适当稀释后，再重新测定。
 - 6、待测样本中存在的人抗鼠等异嗜抗体会干扰检测结果，检测前，请排除该因素。
 - 7、通过其他方法得到的检测结果，与本试剂盒测定结果不具有直接的可比性。

【产品性能指标】

1、物理性能

试剂盒的各液体组分应澄清透明、无沉淀或者絮状物。微孔板铝箔袋应真空包装，无破损漏气。

2、剂量反应曲线线性

校准品剂量反应曲线相关系数 r 值，大于等于 0.9900。

3、精密度

批内精密度：三组已知的高、中、低浓度样品，进行二十次在同一个板块内精度评估。

批内变异系数 CV% 小于 10%。

批间精密度：三组已知的高、中、低浓度样品，进行二十次在不同板块内精度评估。

批间变异系数 CV% 小于 15%。

4、检测范围

31.2pg/ml--2000pg/ml

5、灵敏度

最低检出剂量小于 1.63pg/mL。

6、回收率

三组已知的高、中、低浓度样品，进行五次回收率评估，回收率在 85%-115%之间。

7、特异性

本试剂盒识别天然和重组小鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α)，与结构类似物无交叉。

8、稳定性

2°C-8°C 保存，有效期 6 个月。

仅供科研使用，不得用于临床诊断。

【注意事项】

生物安全

1、检测必须符合实验室管理规范的规定，严格防止交叉污染，所有样品、洗弃液和各种废弃物都应按照传染物进行处置。

2、试剂盒的液体组分中，含有 proclin-300 防腐剂，可能引起皮肤过敏反应，避免吸入烟雾与皮肤接触。

3、底物液对皮肤、眼睛和上呼吸道有刺激作用，避免吸入烟雾。戴上防护手套，实验完成后彻底洗手。

技术提示

1、混合蛋白溶液时，避免起泡。

2、加校准品与样本时，每个校准品浓度和样本都要更换移液枪头，公共组分应该悬臂加样，避免交叉污染。

3、合适的温育时间，和充分的洗涤步骤，是保证实验结果准确性的必要条件。

4、底物溶液为无色液体，保存过程中变为蓝色，代表底物溶液已经失效，不得使用。

5、终止液加样顺序与底物溶液加样顺序一致，加入终止液后，蓝色底物产物，会瞬间变为黄色。

6、实验中，用剩的板条，应立即放回自封袋中，密封（低温干燥）保存。

7、所有液体组分，使用前充分摇匀，严格按照说明书标明的时间、加样量及加样顺序进行温育操作。

废物处理

所有使用或未使用的试剂，所有污染性的一次性材料，应当遵循传染性或潜在传染性产品的处理程序，每个实验室都有责任根据其实验的类型和危险性级别，进行废物和污物的处理，同时要严格依照有关规定对待所有的废物和污物。

www.zcibio.com

Shanghai ZCIBIO Technology Co., Ltd.

TEL: 021-65681082 Email: zcibio@163.com