

大鼠TNF-alpha双抗夹心ELISA检测试剂盒

请在实验前仔细阅读本说明书

产品货号: KE20018
规格: 96T
灵敏度: 1.1 pg/mL
检测范围: 4.7-300 pg/mL
用途: 此试剂盒用于定量检测血清、血浆以及细胞上清中的大鼠TNF-alpha浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

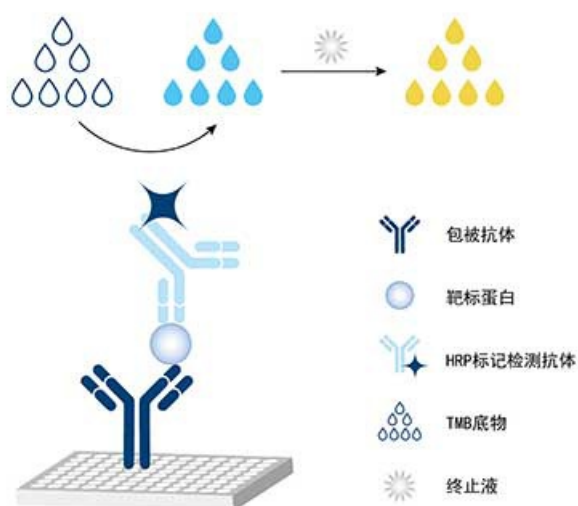
目录

- 一：背景信息 3
- 二：检测原理 3
- 三：需自备的实验器材 3
- 四：试剂盒组分及储存 4
- 五：实验注意事项 4
- 六：样本准备 4
- 七：试剂准备 5
- 八：实验步骤 6
- 九：实验参数 7
 - 9.1 参考标曲图 7
 - 9.2 精密度 7
 - 9.3 加标回收率 8
 - 9.4 样本值 8
 - 9.5 灵敏度 8
 - 9.6 线性 9
- 十：参考文献 9

一：背景信息

TNF又称为TNF-alpha或 cachectin，是一种多功能促炎性细胞因子，属于肿瘤坏死因子超家族。它主要由活化的巨噬细胞产生，它也由许多其他类型的细胞产生，如 CD4 + 淋巴细胞，NK 细胞，嗜中性粒细胞，肥大细胞，嗜酸性粒细胞和神经元。它与 TNFRSF1A/TNFR1和 TNFRSF1B/TNFR 受体结合，从而发挥功能。这种细胞因子参与调节广泛的生物过程，包括细胞增殖、分化、凋亡、脂质代谢和凝血。大鼠和人 TNF- α 有79% 的氨基酸序列相同。与人类 TNF- α 不同，大鼠的TNF- α 是糖基化的。在大鼠缺乏这种基因与细菌感染引起的缺陷相关，以及形成滤泡树突状细胞、初级 B 细胞滤泡的缺陷。

二：检测原理



◀双抗夹心模式图 (检测抗体直标HRP)

按操作顺序形成抗体夹心结构后，加入TMB底物，板孔液体由无色变成蓝色，再加入终止液液体变为黄色后进行吸光度值测定。

三：需自备的实验器材

- 3.1 酶标仪 (可读取450 nm和630 nm双波长);
- 3.2 高精度移液器及一次性移液器枪头;
- 3.3 洗板机 (亦可手动洗板);
- 3.4 EP管 (用于稀释标准品及样本);
- 3.5 吸水毛巾或滤纸 (用于拍干);
- 3.6 烧杯和量筒;
- 3.7 用于ELISA实验的数据分析的统计拟合软件 (推荐四参数拟合方法)，如：Origin，ELISA Calc等。

四：试剂盒组分及储存

英文名称	中文名称	规格	数量
Microplate	预包被酶标板 - 96孔板	8孔 × 12条	1 块
Protein standard	标准品 - 冻干粉状 *	600 pg/瓶	2 瓶
Detection antibody, HRP-conjugated (100×)	HRP标记检测抗体浓缩液 (100×) **	120 µL/支	1 支
Additional Diluent AT-20018	干扰抑制剂 AT-20018 (仅用于血清和血浆样本)	6 mL/瓶	1 瓶
Sample Diluent PT 3-tf	样本稀释液 PT 3-tf (用于大鼠血清和血浆样本)	30 mL/瓶	1 瓶
Sample Diluent PT 3-ef	样本稀释液 PT 3-ef (用于细胞上清样本)	30 mL/瓶	1 瓶
Detection Diluent	抗体稀释液	30 mL/瓶	1 瓶
Wash Buffer Concentrate (20×)	浓缩洗涤液 (20×)	30 mL/瓶	1 瓶
TMB	显色底物 TMB	12 mL/瓶	1 瓶
Stop Solution	终止液	12 mL/瓶	1 瓶
Plate Cover Seals	封板膜		4 张
储存条件： 1：未开启试剂盒可在2-8℃条件下存放6个月或者在-20℃条件下存放1年 2：已开启试剂盒可在2-8℃存放7天 3：每次实验均使用新的标准品,使用后丢弃			

* 使用对应的样本稀释液对标准品进行复溶，复溶过程避免产生气泡

** 开盖前请离心

五：实验注意事项

- 5.1 避免皮肤接触终止液以及TMB 显色液；
- 5.2 在实验过程中，注意穿戴个人防护装备，如实验服，手套，口罩和护目镜；
- 5.3 请勿将不同批次的试剂进行混用，过期产品请勿使用；
- 5.4 在使用自动洗板机时，板孔加入洗涤液之后，设置30秒的浸泡程序，以提高分析的精确度。

六：样本准备

- 6.1 血清：全血标本室温凝固 30 min后1000×g 离心15 min，取上清立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融。
- 6.2 血浆：可用EDTA、肝素或柠檬酸盐作为抗凝剂，标本采集后1000×g 离心15 min，立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融
(注意：标本溶血会影响检测结果，因此溶血标本不宜进行检测)。
- 6.3 细胞上清：收集细胞培养液，500×g 离心5 min取上清，立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融。

七：试剂准备

7.1 洗涤液（1×）：

如果洗涤液（20×）有晶体析出，37℃加热至晶体全部溶解。按1:20稀释倍数进行稀释：如取30 mL 浓缩洗涤液（20×），加入570 mL 超纯水或去离子水，得到洗涤液（1×）。

7.2 HRP标记检测抗体（1×）：

开盖前瞬时离心，按1:100比例进行稀释，稀释前根据预先计算实验所需的总量配制（100 μL/孔），实际配制时应多配制0.1-0.2 mL。如10 μL HRP标记检测抗体浓缩液（100×）加 990μL 抗体稀释液进行配制，轻轻混匀。

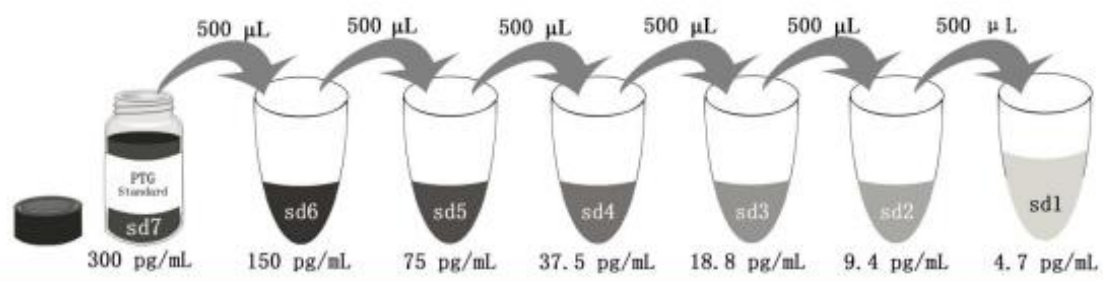
7.3 待检测样本：

不同的样本使用相应的样本稀释液进行稀释，如果样本检测值超过标曲最高范围，可将样本进行一定的稀释后再进行实验，使样本的检测值处于标曲范围内，不同样本的稀释倍数需自行优化。

稀释比推荐如下：大鼠血清和血浆样本1:2稀释；细胞上清样本1:2或1:4稀释；样品采集、处理和储存的差异可能导致测值的改变。

7.4 梯度稀释的标准品：

检测大鼠血清、血浆样本，使用2 mL PT 3-tf样本稀释液复溶标准品；检测细胞上清样本，使用2 mL PT 3-ef 样本稀释液复溶标准品，具体操作如下：



Add # μL of Standard diluted in the previous step	—	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL
# μL of Sample Diluent PT 3-tf or PT 3-ef	2000 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL
	"sd7"	"sd6"	"sd5"	"sd4"	"sd3"	"sd2"	"sd1"

八：实验步骤

实验前,需要将所需试剂在室温平衡20-30 min(HRP标记 检测抗体浓缩液不需要平衡室温,即用即取);在进行标准品、样本以及不同试剂加样时,更换枪头,避免接触微孔板的内表面,不同的试剂,使用不同的加样槽;

8.1 根据实验用量,取出需要用到的酶标板条,剩余板条加入干燥剂放入铝箔袋密封后存放于4°C,并于一周之内用完;

8.2 分别设零孔、标准品孔、待测样本孔:

对于血清血浆样本,零孔、标准品孔以及待测样本孔预先加入50 μ L/孔干扰抑制剂溶液,不需要孵育和洗涤;

对于细胞上清样本,不需要加入干扰抑制剂,可直接进行下一步;

8.3 加样,零孔中加样本稀释液100 μ L,余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本100 μ L/孔;注意不要产生气泡(建议标准品和样本都做复孔,尽量避免实验误差,确保上样不间断,5-10 min完成加样);

8.4 酶标板盖上覆膜,37°C孵育2 h;

8.5 洗涤

1) 揭开封板膜(动作轻柔,避免动作过大导致液体溢出串孔),弃液体,拍干;

2) 洗涤液(1 $\times$)洗涤板条,每孔350-400 μ L,洗涤后,甩掉液体拍干板条,重复此步骤4次,避免异物进入板孔以及板条干燥;

8.6 每孔加100 μ L HRP标记检测抗体(1 $\times$)(参照试剂准备部分7.2),盖上封板膜,37°C孵育40 min;

8.7 重复步骤8.5;

8.8 显色:每孔加TMB显色液100 μ L,37°C避光显色 15-20 min(如果颜色偏浅,可适当延长显色时间,不超过30 min;保持显色底物始终处于避光状态,显色底物在加样前应是无色透明,如有变色,请勿使用);

8.9 终止:每孔加终止液100 μ L,蓝色变黄色。终止液与TMB显色液的加样顺序一致;(注意:眼睛和皮肤避免接触终止液);

8.10 读数:以630 nm为校正波长,用酶标仪在450 nm波长测量各孔的光密度(OD值)。加入终止液后5 min内进行读数,若无630 nm 波长,也可直接使用450 nm 波长读数;

8.11 数据分析:每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值,设置复孔,取其平均值。以标准品的浓度为横坐标,OD 值为纵坐标,使用专业软件(如Origin、ELISACalc等)进行四参数拟合(4-PL),根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度,乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

操作流程如下:

步骤	试剂	体积	孵育时间	洗涤次数	孵育温度
1	干扰抑制剂(仅针对血清、血浆样本)	50 μ L	0 分钟	不需要洗涤	-
2	标准品或样本	100 μ L	120 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
3	HRP标记检测抗体(1 $\times$)	100 μ L	40 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
4	显色 TMB	100 μ L	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37°C孵育,避光
5	终止液	100 μ L	0 分钟	不需要洗涤	-
6	加入终止液后以630 nm为校正波长,在450 nm处测量OD值,此过程建议不超过5分钟				

九：实验参数

9.1 参考标曲图

9.2 精密度

板内精密度：3个不同浓度的样本在板内重复测定 20次；

板间精密度：3个不同浓度的样本在板间重复测定 24次。

板内精密度 (CV内)					板间精密度 (CV 间)				
样本	数量	平均值 (pg/mL)	标准差	变异系数CV%	样本	数量	平均值 (pg/mL)	标准差	变异系数CV%
1	20	129.4	4.0	3.1	1	24	137.6	10.2	7.4
2	20	30.5	0.6	1.9	2	24	31.3	1.3	4.1
3	20	7.7	0.3	3.6	3	24	8.4	0.5	6.4

9.3 加标回收率

样本稀释后，在标曲范围内选择高、中、低3个浓度，进行大鼠TNF-alpha的加标回收率实验，结果如下：

样本类型	稀释倍数	均值 (%)	范围 (%)
大鼠血清	1:2	74	66-80
	1:4	80	70-91
细胞上清	1:2	96	80-129
	1:4	99	81-126

9.4 样本值

大鼠血清-本实验从16只大鼠提取血清用于检测TNF-alpha的含量，所有样品均低于标曲最低范围4.7 pg/mL。

细胞上清-大鼠脾细胞（ 1×10^7 cells/mL）在添加10%胎牛血清的DMEM培养基中培养2天，用5.0 μ g/mL ConA刺激细胞，收集细胞上清，并测定大鼠TNF-alpha的浓度。

刺激条件	(pg/mL)
未刺激	0.0
刺激	145.2

9.5 灵敏度

用20个重复的零孔平均OD值加上两倍标准差得到的OD值带入标准曲线拟合出对应的浓度值，此试剂盒中大鼠TNF-alpha的灵敏度为1.1 pg/mL。

9.6 线性

大鼠血清加入高浓度的大鼠TNF-alpha蛋白，梯度稀释后检测样本加标线性，细胞上清用对应样本稀释液稀释样本，使稀释后的检测值处于标曲范围内，线性数据如下：

稀释倍数		大鼠血清 (样本稀释液 PT 3-tf)	细胞上清 (样本稀释液 PT 3-ef)
1:2	均值 (%)	78	100
	范围 (%)	74-82	-
1:4	均值 (%)	80	110
	范围 (%)	75-83	107-112
1:8	均值 (%)	90	108
	范围 (%)	87-95	95-117
1:16	均值 (%)	90	111
	范围 (%)	88-93	103-122

十：参考文献

1. Agbanoma G. et al. (2012) J Immunol. 188: 1307-17.
2. Kriegler M. et al. (1988) Cell. 53: 45-53.
3. Theiss AL. et al. (2005) J Biol Chem. 280: 36099-109.
4. Swardfager W. et al. (2010) Biol Psychiatry. 68:930-41.
5. Locksley RM. et al. (2001) Cell. 104(4):487-501.