

兔肿瘤坏死因子- α 定量检测试剂盒

Rabbit TNF- α ELISA kit

说明书修订日期：2020.11.20

Cat number: KGEB007/ KGEB007-1

Store at 4°C for six months

For Research Use Only (科研专用)

一、试剂盒说明

本实验采用双抗体夹心ABC-ELISA法。用抗兔TNF- α 单抗包被于酶标板上，标准品与样品中的兔TNF- α 与单抗结合，加入生物素化的抗兔TNF- α 抗体，形成免疫复合物连接在板上，辣根过氧化物酶标记的Streptavidin与生物素结合，加入酶底物TMB，出现蓝色，加终止液硫酸，颜色变黄，在450nm处测OD值，兔TNF- α 浓度与OD值成正比，可通过绘制标准曲线求出标本中兔TNF- α 浓度。

二、试剂盒组份

组份	48T	96T
酶标板(已包被抗兔TNF- α)	48孔	96孔
样品稀释液	3ml	6ml
酶标试剂	5ml	10ml
显色剂A液	3ml	6ml
显色剂B液	3ml	6ml
终止液	3ml	6ml
洗涤液(20 \times)	15 mL	25mL
标准品	0.3ml \times 6管	0.3ml \times 6管
封板纸	2张	2张

注：标准品浓度依次为320、160、80、40、20、0 pg/ml.

三、试剂盒以外自备仪器和试剂

洗涤液：用双蒸水 1:20 稀释。

四、使用注意事项

1. 以上标准孔及待查样品均建议做复孔，每次测定应同时制作标准曲线。
2. 底物液使用前建议先行检查，若溶液颜色发蓝则已失效，弃去。
3. 本试剂盒取出的试剂在室温条件下使用，溶液应轻轻摇匀后使用。从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶，这属于正常现象，加热使结晶完全溶解后再配制。
4. 本试剂盒含 2M 硫酸，不要将它与含叠氮化钠的废物混在一起。
5. 板条开封后剩余板条要再封好，保持板条干燥。
6. 不同批号的试剂盒组分不能混用。
7. 正确拿酶标板：不要接触板的底部，否则会影响度数。

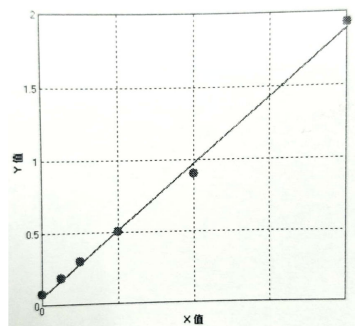
五、操作方法

1. 实验前 20 分钟从冰箱中取出试剂盒，以平衡至室温（20-25 $^{\circ}$ C）；
2. 取出所需数量的板条，其余密封放回 4 $^{\circ}$ C；
3. 标准品加样：设置标准品孔和样本孔，标准品孔各加不同浓度的标准品50 μ l；
4. 分别设空白孔（空白对照孔不加样品及酶标试剂，其余各步骤操作相同）、待测样品孔。在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液40 μ l,再加待测样品10 μ l（样品最终稀释度为5倍）。加样将样品加于酶标板孔底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀。

5. 加酶：每孔加入酶标试剂100 μ l，空白孔除外；
6. 温育：用封板膜封板后置37 $^{\circ}$ C 孵育60min；
7. 洗涤：小心揭掉封板膜，弃去液体，甩干，每孔加满洗涤液，静置30s后弃去，反复5次，甩干；
8. 显色：每孔先加显色剂A 50 μ l，再加入显色剂B 50 μ l，轻微震荡混匀，37 $^{\circ}$ C 避光显色15min；
9. 终止：每孔加终止液50 μ l，终止反应（此时蓝色转黄色）；
11. 测定：以空白孔调零，450nm波长依序测定各孔中吸光度值（OD值），测定应在加终止液后5min内进行。

结果计算与判断：1.以标准物的浓度为横坐标，OD值为纵坐标，绘出标准曲线，根据样品的OD值由标准曲线查出相应的浓度；再乘以稀释倍数；或用标准物的浓度与OD值计算出标准曲线的直线回归方程式，将样品的OD值带入方程，计算出样品浓度，在乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。

2.



（仅供参考）

六、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。

- 1、血清：用干净试管收集血液，室温凝固 10-20 分钟，离心 1000 \times g 15 分钟，收集血清。立即分析或分装后-20 $^{\circ}$ C冷冻保存。
- 2、血浆：采用 EDTA 抗凝，抽血后 30 分钟内离心 1000 \times g 15 分钟，立即分析或分装后-20 $^{\circ}$ C冷冻保存。
- 3、细胞培养、组织匀浆、体液：离心去除沉淀，立即分析或分装后-20 $^{\circ}$ C冷冻保存。

七、性能参数

灵敏度：最小可测兔TNF- α 达 1.0pg/ml

重复性：板内变异系数<10%

板间变异系数<15%