

# 兔肿瘤坏死因子- $\alpha$ 定量酶联检测试剂盒

## Rabbit TNF- $\alpha$ ELISA kit

说明书修订日期: 2017.05.27

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- $\alpha$ 单抗包被于酶标板上,标准品与样品中的兔TNF- $\alpha$ 与单抗结合,加入生物素化的抗兔TNF- $\alpha$ 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- $\alpha$ 浓度与OD值成正比,可通过绘制标准曲线求出标本中兔TNF- $\alpha$ 浓度。

### 二、试剂盒组份

组份	48T	96T
酶标板(已包被抗兔 TNF- $\alpha$ )	48 孔	96 孔
样品稀释液	5 mL	5mL
第一抗体工作液	2.7ml	5.5ml
酶标抗体工作液	5.5ml	10.5ml
底物液	1 瓶	2 瓶
终止液	3ml	6ml
洗涤液(20 $\times$ )	25 mL	50 mL
标准品 (冻干粉, 2000pg/ml)	1 管	2 管
坐标纸	1 张	1 张
封板纸	1 张	1 张

### 三、试剂盒以外自备仪器和试剂

- 1、标准品液配制: 使用前每管中加入蒸馏水 400ul 溶解后即可。
- 2、洗涤液: 用重蒸水 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°C);
2. 取出所需数量的板条,其余密封放回 4°C;
3. 建立标准曲线: 设标准孔 8 孔,每孔中各加入样品稀释液 100ul,第一孔加标准品 100nl,混匀后用加样器吸出 100ul,移至第二孔。如此反复对倍稀释至第七孔,最后,从第七孔中吸出 100ul 弃去,使之

体积均为 100ul。第八孔为空白对照；

4. 加样：待测品孔中每孔加入待测样品 100ul；
5. 将反应板置 37℃120 分钟；
6. 洗板：用洗涤液将反应板充分洗涤 4-6 次，向滤纸上印干；
7. 每孔中加入第一抗体工作液 50ul；
8. 将反应板充分混匀后置 37℃60 分钟。
9. 洗板：用洗涤液将反应板充分洗涤 4-6 次，向滤纸上印干；
10. 每孔加酶标抗体工作液 100uL.
11. 将反应板置 37℃60 分钟。
12. 洗板：同前。
13. 每孔加入底物液 100uL，置 37℃暗处反应 5-10 分钟。
14. 每孔加入 50uL 终止液混匀。
15. 在 450nm 处测吸光值。（应尽快，时间过长可能导致本底偏高）

结果计算与判断：

- 1.所有 OD 值都应减除空白值后再计算；
- 2.以标准品 1000、500、250、125、62.5、31.25、15.62、0pg/ml 之 OD 值在半对数纸上作图，画出标准曲线，将浓度作为 X 轴（对数轴），OD 值作为 Y 轴（线性轴）。曲线应为一光滑曲线。
- 3.根据样品 OD 值在该曲线图上查出相应兔 TNF- $\alpha$ 含量。

## 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 30 分钟，离心 1000×g15 分钟，收集血清。立即分析或分装后-20℃冷冻保存。
- 2、血浆：采用 EDTA 抗凝，抽血后 30 分钟内离心 1000×g15 分钟。立即分析或分装后-20℃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℃冷冻保存。

## 七、性能参数

灵敏度：最小可测兔 TNF- $\alpha$  达 8pg/ml

重复性：板内变异系数<10%

板间变异系数<15%