



**A&E Bio**

# 小鼠 (Mouse) 肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) 酶联免疫吸附测定检测试剂盒

## 使用说明书

- ◆种 属：小鼠
- ◆规 格：48T/96T
- ◆保存温度：2-8 °C
- ◆货 号：AE20220M
- ◆检测范围：5.6-400pg/mL
- ◆保 质 期：6 个月

公司网址：[www.ae-bio.com](http://www.ae-bio.com)

E-mail：[aebio666@163.com](mailto:aebio666@163.com)



## 检测原理

本试剂盒利用抗原抗体特异性结合原理开展双抗体夹心法酶联免疫吸附试验（Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA），即通过向预先包被有小鼠肿瘤坏死因子 $\alpha$ （TNF- $\alpha$ ）抗体的微孔中，依次加入待测标本、标准品等试剂和辣根过氧化物酶（Horseradish peroxidase, HRP）标记的检测抗体，经过孵育和洗涤后，用底物TMB显色。TMB在HRP的催化下会变成蓝色，并在酸的作用下最终变成黄色。孵育完成后，用酶标仪在450nm波长下测定溶液吸光度值（OD值），结合标准曲线计算样品浓度。液体颜色的深浅和样品中的目的蛋白或分子含量呈正相关。

**灵敏度：1.0pg/mL**

**特异性：**本试剂盒仅识别小鼠组织标本中的TNF- $\alpha$ ，与其他类似蛋白或分子无明显交叉反应。

## 注意事项

1. 本试剂盒仅用于小鼠内源性 TNF- $\alpha$  蛋白浓度测定，不可用于其他物种 TNF- $\alpha$  含量检测。
2. 所有试剂在使用前应平衡至室温（20-25 °C），使用完后立即置于 2-8 °C 保存。
3. 请按照推荐的温度和时间孵育微孔板，孵育时避免强光直接照射。
4. 操作要认真仔细，确保加入试剂体积和质量的准确性。
5. 建议将待测样品用样本稀释液按一定比例（至少 2 倍）稀释后再加入酶标板，以减少基质效应对检测结果的影响。在计算样品浓度时，乘以对应稀释比例，即得样品原始浓度。
6. 洗板动作要轻柔，尽量沿孔壁加入液体，切记强力冲洗板底；同时注意吸尽残存液体。
7. 孵育过程中注意防止微孔板液体蒸发，导致“干板”。
8. 在使用酶标仪测量前，注意彻底清除板底残留液体、污渍和指纹，以免影响实验结果。
9. 底物显色液应为无色或浅色，变蓝后不可用于实验检测。
10. 有序存放试剂和标本，避免交叉污染。
11. 不能使用过期或变质产品，不同货号 and 批次产品不得混合使用。
12. 实验剩余的板条应立即放回自封袋中，密封后低温干燥保存。
13. 在使用本试剂盒时，请注意做好个人防护。
14. 完成检测后，请按照废弃试剂处理要求处置相关样品、试剂及耗材。

**本试剂盒仅供科学研究，不得用于医学诊断。**



## 样品收集及保存方法

- 血清：**使用血清分离管收集全血标本，室温（约 25 °C）放置 2 小时或 4 °C 冰箱放置过夜，3000 转离心 10 分钟或 1000 g 离心 20 分钟，取上清立即检测，或将上清置于 -20 °C 或 -80 °C 冰箱保存，但应避免反复冻融。
- 血浆：**用 EDTA 或肝素抗凝管采集血液标本，在 4 °C 条件下 3000 转离心 20 分钟或 1000 g 离心 15 分钟，取上清立即检测，或将上清置于 -20 °C 或 -80 °C 冰箱保存，但应避免反复冻融。
- 组织匀浆：**使用预冷的 PBS（pH=7.0-7.4）溶液洗涤组织，尽量洗去残存血液（裂解的红细胞会影响测量结果准确性），称重后将组织剪碎，按 1:9 的质量体积比（即 1 g 组织加入 9 mL 溶液）加入 PBS 溶液（建议加入适量蛋白酶抑制剂），采用玻璃匀浆器充分研磨。后将匀浆液转入离心管中，5000 g 离心 10 分钟，取上清立即检测，或将上清置于 -20 °C 或 -80 °C 冰箱保存，但应避免反复冻融。
- 细胞培养上清：**吸取细胞培养液，1000 g 离心 20 分钟，取上清立即检测，或将上清置于 -20 °C 或 -80 °C 冰箱保存，但应避免反复冻融。
- 其他标本：**视具体情况确定，腹腔积液、胸腔积液和关节积液等的收集和存储方法同细胞培养上清。
- 样品外观：**样品在液态时应澄清透明，处理时应尽量通过离心去除悬浮物和漂浮物。
- 样品保存：**样本收集后如在一周内检测，可置于 4 °C 保存；若不能及时检测，请按一次使用量进行小份分装，置于 -20 °C（1 个月内检测）或 -80 °C（半年内检测）保存，避免反复冻融。

## 自备物品

- 酶标仪（检测波长 450 nm）。
- 高精度移液器及枪头：0.5-10  $\mu$ L、2-20  $\mu$ L、20-200  $\mu$ L 和 100-1000  $\mu$ L。
- 37°C 恒温孵育箱。
- 蒸馏水或去离子水。



## 试剂盒组成

名称	96T	48T	备注
微孔酶标板	12 孔×8 条	12 孔×4 条	无
标准品	0.3mL*6 管	0.3mL*6 管	无
样本稀释液	6mL	3mL	无
检测抗体-HRP	10mL	5mL	无
20×洗涤缓冲液	25mL	15mL	按说明书进行稀释
底物 A	6mL	3mL	无
底物 B	6mL	3mL	无
终止液	6mL	3mL	无
封板膜	2 张	2 张	无
说明书	1 份	1 份	无
自封袋	1 个	1 个	无

注：标准品（S0-S5）浓度依次为：0、25、50、100、200、400 pg/mL。

## 检测前准备工作

1. 提前 10 分钟将试剂盒从冰箱中取出，平衡至室温（20-25 °C）。
2. 1×洗涤缓冲液配制：按 10 mL 20×洗涤缓冲液+190 mL 蒸馏水或去离子水的比例稀释洗涤缓冲液。冰箱放置的洗涤缓冲液可能出现结晶，属正常现象，可放置在室温，待其充分溶解后再配制 1×洗涤缓冲液。

## 操作步骤

1. 将铝箔袋在室温平衡 20 分钟，从中取出所需板条，剩余板条使用自封袋密封，4°C 干燥保存。
2. 设置标准品孔和样本孔，向各标准品孔中滴加不同浓度的标准品溶液 50 μL，同时建议设置复孔。
3. 检测样本孔先加待测样本溶液 10 μL，再加样本稀释液 40 μL，空白孔不加样本。
4. 除空白孔外，按 100 μL/孔的量向标准品孔和待测样本孔中加入 HRP 标记的检测抗体，然后使用封板膜密封反应孔，37°C 水浴锅或恒温箱孵育 1 小时。
5. 弃去孔中液体，吸水纸（建议使用无纸屑残留的擦手纸）上控干残存液体，加满 1×洗涤缓冲液，静置 1 分钟，甩干洗涤缓冲液，吸水纸上控干，重复洗板 5 次（也可用洗板机洗板）。

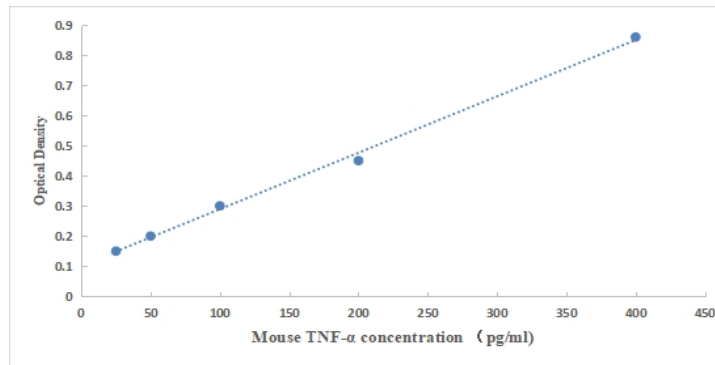


6. 每孔加入底物 A 和 B 各 50  $\mu\text{L}$ ，37 $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 15 分钟。
7. 每孔加入终止液 50  $\mu\text{L}$ ，将酶标仪检测波长设置为 450 nm，在 15 分钟内测定各孔的 OD 值。

## 实验结果计算

1. 标准曲线绘制：计算标准品和待测样本各复孔的平均 OD 值，减去空白孔的 OD 值，作为校正 OD 值。以浓度为横坐标，对应 OD 值为纵坐标，在 Excel 工作表中绘制出标准品线性回归曲线。
2. 按曲线方程计算各样本浓度值。若样品 OD 值高于标准曲线上限，应对样品做适当稀释，计算出结果后乘以相应稀释倍数，即得目的分子原始浓度。
3. 标准曲线示例。此数据和曲线仅供参考，实验人员应根据自身试验建立标准曲线，计算样本目的分子浓度。

浓度 (pg/mL)	400	200	100	50	25	0
测定 OD 值	0.94	0.53	0.38	0.28	0.23	0.08
校正 OD 值	0.86	0.45	0.3	0.2	0.15	-



注：本图和标准曲线仅供参考，应以同批次试验标准品对应 OD 值绘制标准曲线，计算目的分子含量。

## 试剂盒性能

1. 准确性：标准品线性回归与预期浓度相关系数 R 值应大于等于 0.9900。
2. 重复性：板内变异系数小于 15%、板间变异系数小于 15%。
3. 特异性：与其它可溶性结构类似物无交叉反应。



# A&E Bio

## 免责声明

1. 本试剂盒仅供科学研究使用，不得用于临床检验或人体实验，否则一切后果由实验者承担，本公司概不负责。
2. 请严格按照说明书要求进行实验操作，违反说明书操作规范，造成后果的由实验者承担。

本试剂盒仅供科学研究，不得用于医学诊断。