

ELISA试剂盒使用说明书

Mouse TNF- α ELISA KIT



全国统一热线：400-600-4213
www.biosharp.cn

本试剂盒用于体外定性或定量检测小鼠血清、血浆或细胞培养上清液及其它生物体液中的TNF- α 浓度。使用前请仔细阅读说明书并检查试剂组分，如有任何疑问请与合肥兰杰柯科技有限公司联系，公司将为您提供强有力的技术支持。

目录

一、产品简介	2
二、检测原理	2
三、试剂盒组分	3
四、储存条件	3
五、其它实验材料	3
六、使用说明	3
6.1、样品收集方法	3
6.2、样本收集注意事项	4
6.3、样本保存	4
6.4、试剂准备	4
6.5、洗板方法	5
6.6、检测程序	5
6.7、检测程序总结	5
6.8、结果判断与计算	5
6.9、操作要点提示	6
七、常见问题分析及解决办法	6

Mouse TNF-α (肿瘤坏死因子α) ELISA KIT

货号	名称	规格
BSEM-004-48T	Mouse TNF-α (肿瘤坏死因子α) ELISA KIT	48T
BSEM-004-96T	Mouse TNF-α (肿瘤坏死因子α) ELISA KIT	96T

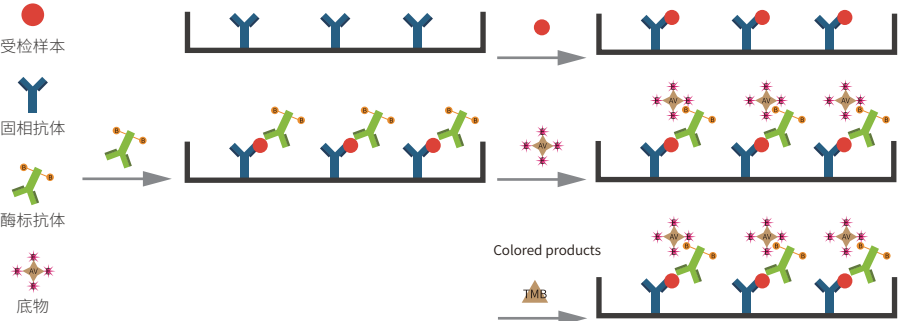
一、产品简介

肿瘤坏死因子-α (TNF-α或TNF) 由巨噬细胞分泌，以应对炎症、感染和癌症。人肿瘤坏死因子 (TNF) 和淋巴毒素 (TNF-β) 是具有相似生物活性的细胞毒性蛋白质，氨基酸同源性为30%。TNF-α由单核细胞产生，可刺激内皮细胞产生多系生长因子-粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子，并将这种免疫调节蛋白的作用扩展到体外造血调节。TNF是一种可溶性蛋白质，可导致肿瘤细胞受损，但对正常细胞无影响。

检测范围	31.25–2000pg/ml			灵敏度		1.6pg/ml		
标准曲线 (pg/ml)	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	Blank
	2000.0	1000.0	500.0	250.0	125.0	62.5	31.25	0
重复性	板内板间变异系数<10%							
特异性	可检测样本中小鼠的TNF-α, 且与其类似物无明显交叉反应							

二、检测原理

试剂盒采用双抗体夹心ELISA法:捕获抗体已预包被于酶标板上,当加入样品或标准品时,靶蛋白会与捕获抗体结合,其它游离的成分通过洗涤的过程被除去。加入生物素化的抗体后,会与靶蛋白结合从而形成夹心的免疫复合物,其它游离的成分通过洗涤的过程被除去。随后加入辣根过氧化物酶标记的亲合素。生物素与亲合素特异性结合,亲合素连接的酶就会与夹心的免疫复合物连接起来;其它游离的成分通过洗涤的过程被除去。最后加入显色剂,若样本中存在靶蛋白,将会形成免疫复合物,辣根过氧化物酶会催化无色的显色剂氧化成蓝色物质,在加入终止液后呈黄色。通过酶标仪检测,读其450nm处的OD值,靶蛋白浓度与OD₄₅₀值之间呈正比,通过绘制标准曲线,对照未知样本中OD值,即可算出标本中靶蛋白浓度,从而对检测样品进行定性或相对定量分析。



三、试剂盒组成

组分编号	组分	48T	96T
BSEM-004-1	预包被酶标板	8×6条	8×12条
BSEM-004-2	标准品S (10×)	1支	1支
BSEM-004-3	标准品/样品稀释液	15ml	15ml
BSEM-004-4	生物素化检测抗体 (100×)	1支	1支
BSEM-004-5	生物素化检测抗体稀释液	6ml	12ml
BSEM-004-6	SABC复合物 (100×)	1支	1支
BSEM-004-7	SABC复合物稀释液	6ml	12ml
BSEM-004-8	TMB显色液A	3ml	6ml
BSEM-004-9	TMB显色液B	3ml	6ml
BSEM-004-10	终止液	3ml	6ml
BSEM-004-11	30×浓缩洗涤液	30ml	30ml
BSEM-004-12	封板胶纸	2张	4张
	说明书	1份	1份

四、储存条件

试剂盒2-8℃保存，有效期6个月，酶标板拆开后建议一个月内使用完毕。

五、其它实验材料

- 1.酶标仪 (450nm)
- 2.高精度可调移液器及吸头：0.5-10, 2-20, 20-200, 200-1000μL；一次检测样品较多时，最好用多通道移液器
- 3.自动洗板机或洗瓶
- 4.双蒸水或去离子水

六、使用说明

6.1、样品收集方法

- 1.血清：室温血液自然凝固10-20分钟后，离心20分钟左右 (2000-3000转/分)，收集上清-20℃或者-80℃冷冻保存。
- 2.血浆：应根据试剂盒的要求选择EDTA、柠檬酸钠或肝素作为抗凝剂，抗凝血离心20分钟左右 (2000-3000转/分)，仔细收集上清，-20℃或者-80℃冷冻保存。
- 3.尿液、胸腹水、脑脊液、肺泡灌洗液：用无菌管收集，离心20分钟左右 (2000-3000转/分)，仔细收集上清，-20℃或者-80℃冷冻保存。
- 4.细胞上清液：用于检测分泌性的成分，用无菌管收集，离心20分钟左右 (2000-3000转/分)，仔细收集上清；检测细胞内的成分时，用PBS稀释细胞悬液，细胞浓度达到100万/ml左右，通过超声破碎或反复冻融 (利用液氮和37℃水浴对样品进行两到三次快速的冻融)，以使细胞破坏并放出细胞内成份，离心20分钟左右 (2000-3000转/分)，仔细收集上清 (如需要可取部分进行BCA蛋白定量)，-20℃或者-80℃冷冻保存。
- 5.组织标本：切割标本后，准确称取组织重量。按重量(g):体积(mL)=1:9的比例，加入9倍体积的匀浆介质PBS，用手工或匀浆器将标本匀浆充分，离心20分钟左右 (2000-3000转/分)，仔细收集匀浆上清 (如需要可取部分进行BCA蛋白定量)，-20℃或者-80℃冷冻保存。
- 6.保存：若样品不立即检测，请将其按一次用量分装，-20℃保存，避免反复冻融，室温下解冻，请勿于37℃或更高的温度加热解冻。尽量避免使用溶血或高血脂或污染的样本，否则结果将不准确。

6.2、样本收集注意事项

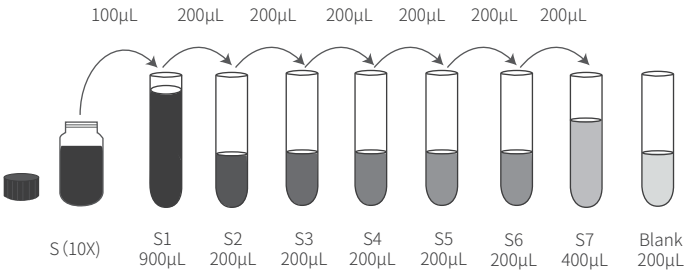
- 1.每个标本量收集体积 $\approx 60\mu\text{L} \times \text{检测指标}$,如要做复孔,标本量收集体积 $\approx 60\mu\text{L} \times \text{检测指标} \times 2$,更多复孔以此类推。
- 2.收集标本前必须清楚要检测的成份是否足够稳定,以确定样本保存温度,保存条件参考样本保存。
- 3.血清标本采集时,应注意避免溶血,红细胞溶解时会释放出具有过氧化物酶活性的物质,以HRP为标记的ELISA测定中,溶血标本可能会增加非特异性显色。
- 4.为了保证尿液检测结果的准确性,必须正确收集尿液标本和保存,盛尿容器要清洁干燥。最好使用一次性的容器(如塑料尿杯),避免因用药并清洗不干净而造成的污染,影响检测结果,尿液标本必须新鲜,留取后,应及时检测或保存,以免细菌繁殖,因在室温(尤其是夏季)中久置后尿中的磷酸盐等可析出结晶而干扰检测。
- 5.冻结标本融解后,蛋白质局部浓缩,分布不均,应充分轻缓混匀,避免气泡,可上下颠倒混和,不要在混匀器上强烈振荡。
- 6.混浊或有沉淀的标本应先离心或过滤,澄清后再检测。
- 7.反复冻融会使蛋白效价降低,所以待测标本如需保存作多次检测,宜少量分装冰存。也可加入适当防腐剂。
- 8.激素类标本需添加抑肽酶。

6.3、样本保存

1. 4°C 保存:1-4天检测的样本,超过时间的需低温保存。
2. -20°C 或 -80°C 保存:对收集后当天进行检测的标本,储存在 4°C 备用,如有特殊原因需要周期收集标本,将标本及时分装后放在 -20°C 或 -80°C 条件下保存。避免反复冻融。
- 3.一般情况下,标本 4°C 可保存48小时, -20°C 下可保存1个月, -80°C 下可保存6个月。

6.4、试剂准备

- 1.提前20分钟从冰箱中取出试剂盒,平衡至室温,读数前15分钟打开酶标仪预热。
- 2.洗涤液配置:用蒸馏水1:30稀释(例:1mL浓缩洗涤液加入29mL的蒸馏水)。
- 3.标准品配制:取8个1.5mL离心管,分别标注S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, Blank, 第一管S1中加入标准品/样品稀释液900 μL , S2至Blank中分别加入标准品/样品稀释液200 μL ,在第一管S1中加入标准品S($10\times$)溶液100 μL 置于漩涡混合器上混匀后用加样器吸出200 μL 移至S2,如此反复作对倍稀释至S7混匀,Blank为空白对照。(标准品的用量也可根据自己需要配置)



标准品稀释方法

4.生物素化抗体工作液配置:使用前20分钟,用生物素化抗体稀释液将 $100\times$ 生物素化抗体稀释成 $1\times$ 工作液,根据所需用量配置,当日使用,剩余弃之。

5.SABC复合物工作液配置:使用前20分钟,用SABC复合物稀释液将 $100\times$ 浓缩SABC复合物稀释成 $1\times$ 工作液,当日使用,剩余弃之。

6.TMB显色液的配置:使用前10分钟,将TMB显色液A液和B液1:1混合,避光放置备用。

7.如果您检测的样本中靶蛋白浓度高于标准品最高值,建议重新检测,请根据实际情况,适当倍数稀释(建议做预实验,以确定稀释倍数)。

8.当标准品/样品稀释液及洗涤液不够用时,可以用1xPBST替代。

6.5 洗板方法

(1)手工洗板方法:

吸去(不可触及板壁)或甩掉酶标板内的液体,在实验台上铺垫几层吸水纸,酶标板朝下用力拍几次,将 $1\times$ 洗涤缓冲液至少 $300\mu\text{L}$ 注入孔内,浸泡1-2分钟。根据需要,重复此过程数次。

(2)自动洗板:

1.洗板前,应检查洗液瓶、蒸馏水瓶是否充足,废液瓶是否满瓶。

2.在自检过程中注意观察洗液灌注是否通畅,排液是否通畅。

3.在洗板过程中,应注意观察反应孔每孔是否灌满且无外溢,每孔吸水是否吸尽,并且要保证洗液在孔中放置的时间。

6.6 检测程序

1.加样:空白孔加入 $50\mu\text{L}$ 标准品/样品稀释液,其余孔各对应加入标准品或待测样品 $50\mu\text{L}$,贴上封板胶纸,将反应板混匀后置 37°C ,50分钟。

2.洗板:用 $1\times$ 洗涤液将反应板充分洗涤3次,每孔加入 $1\times$ 洗液 $300\mu\text{L}$,每次震荡/浸泡1-2分钟,向滤纸上印干。

3.加抗体:空白孔加入 $100\mu\text{L}$ 生物素化抗体稀释液,其余孔各加入 $1\times$ 的生物素化抗体工作液 $100\mu\text{L}$,贴上封板胶纸,混匀后置 37°C ,50分钟。

4.洗板:同上。

5.加SABC:每孔加入SABC复合物工作液 $100\mu\text{L}$,贴上封板胶纸,混匀后置 37°C ,30分钟。

6.洗板:同上。

7.加显色液:每孔加入提前配置好的TMB混合液 $100\mu\text{L}$,混匀后贴上封板胶纸,置于 37°C 暗处反应10-20分钟(具体显色时间根据显色结果而定)。

8.加终止液:每孔加入 $50\mu\text{L}$ 终止液,混匀,30分钟内用酶标仪在 450nm 处测吸光值。

6.7 检测程序总结

1.加样品及标准品, 37°C 反应50分钟。洗涤3次。

2.加生物素化检测抗体, 37°C 反应50分钟。洗涤3次。

3.加SABC复合物, 37°C 反应30分钟。洗涤3次。

4.加TMB显色液, 37°C 反应10-20分钟。

5.加入终止液,读数。

6.8 结果判断与计算

1.所有OD值建议减去空白孔值后再进行计算,如空白孔OD低于0.1,也可以直接计算。

2.以标准品浓度作横坐标,OD值作纵坐标,手工绘制或用软件绘制标准曲线,根据样品OD值计算出相应含量,再乘以稀释倍数即可。

6.9 操作要点提示

- 1.配制各种试剂时要充分混匀,但要避免产生大量泡沫,以免加样时加入大量的气泡,产生加样误差。
- 2.为避免交叉污染,在加入不同浓度的标准品、不同样品、不同试剂时谨记及时更换吸头。
- 3.为了确保准确的结果,在每次孵育前均需使用新封板胶纸封住反应孔。
- 4.显色剂在添加之前,应保持无色,请勿使用已变为蓝色的显色溶液。最佳显色时间对标准曲线很重要,肉眼可见前3-4孔有梯度蓝色,后3-4孔差别不明显,零孔无蓝色出现即可终止。
- 5.每次检测均要做标准曲线,根据样品待测因子的含量,适当稀释或浓缩样本,最好做预实验。
- 6.若所检样本不包含在说明书所列样本之中,建议进行预实验验证其有效性,并注意留存样本。
- 7.使用化学裂解液制备的组织匀浆或细胞提取液可能会由于某些化学物质的引入导致ELISA实验结果偏差。
- 8.若样本为细胞培养上清,因该类样本干扰因素较多,如:细胞状态、细胞数量、采样时间等,所以可能存在检测不出的情况。
- 9.某些天然蛋白或重组蛋白,包括原核及真核重组蛋白,可能因为与本产品所使用的检测抗体及捕获抗体不匹配,而不被检测出。
- 10.建议使用新鲜样本,保存时间过长可能会存在蛋白降解或变性导致实验结果偏差。
- 11.在试验中标准品和样本检测时建议作双孔检测,每次检测都应做标准曲线。
- 12.洗涤过程很关键,洗涤不充分将导致精确度误差及OD值错误地升高,从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶,属于正常现象,37℃水浴使结晶完全溶解后再配制洗涤液。
- 13.检测时所有试剂都要恢复到室温,板条开封后剩余板条需封好,放回袋中1个月内用完。
- 14.不同批号的试剂盒组份不能混用(反应终止液除外)。
- 15.本产品仅限于专业人员的科学研究用,不得用于临床诊断或治疗,不得用于食品或药品,不得存放于普通住宅内。
- 16.为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作。

七、常见问题分析及解决

标准曲线较差

原因	解决方案
标准品溶液配置有误	确认是否进行正确稀释
标准品复溶不当	开盖前进行离心;检查复溶后是否存在不溶物
标准品已降解	按推荐方式保存和处理标准品
曲线的标度不适合	尝试使用不同标度绘制曲线
移液器加样误差	正确使用经过校准的移液

无信号

原因	解决方案
原因	样品在 4℃孵育过夜,或遵循试剂的实验方案。
孵育时间过短	减小样品的稀释倍数或浓缩样品。
靶标含量低于检测范围	对于没有验证过的样品类型,检测信号可能减弱或没有使用验证过的样品类型作为阳性对照同时进行检测。
样品类型不适用	使用直接或间接 ELISA 方法增强检测肽的能力,将肽偶联到大的载体蛋白上,然后包被到微量滴定板。
抗原表位被孔板吸附,无法识别	确保检测缓冲液与靶标兼容(例如,保留酶活性、保留蛋白质相互作用)
检测试剂不足	遵循试剂的实验方案,增加检测试剂的浓度或用量。
样品制备不正确	确保进行正确的样品制备/稀释。样品可能与微量滴定板测定形式不兼容。
抗体不足	尝试不同的抗体浓度/稀释。

孵育温度过低	确保在正确温度下进行孵育。所有试剂 (包括孔板) 在进行实验前应处于室温, 或试剂的实验方案所建议的温度。
波长不正确	确认波长, 再次读板。
孔板被强力洗涤	检查并确保自动洗涤系统的压力正确。如果手动洗涤, 则轻轻吸取冲洗缓冲液。
孔变干	测定开始后, 不要让孔变干。将所有的孵育步骤使用封口膜或胶带密封孔板。
酶反应的显色速度慢	使用前配制底物溶液。确保母液未过期、未污染。延长孵育时间。
试剂盒没有充分平衡	试剂室温平衡至少 20 分钟, 确保所有试剂已平衡至室温。

变异系数 (CV) 较大

原因	解决方案
孔中有气泡	读板前, 确保不存在气泡。
孔洗涤不均/未充分洗涤	检查洗板机的所有管口是否畅通。使用推荐方法进行洗涤。
试剂混匀不充分	确保所有试剂充分混匀。
移液量不一致	正确使用经过校准的移液器
边缘效应	确保孔板和所有试剂处于室温。
样品制备或保存条件不一致	确保样品制备保持一致, 使用最优的样品保存条件 (例如尽可能减少反复冻融)。

背景偏高

原因	解决方案
孔洗涤不充分	按照实验方案建议进行洗涤。
洗涤缓冲液污染	制备新鲜的洗涤缓冲液。
检测试剂过多	确保试剂被正确稀释或者减少检测试剂的推荐浓度。
封闭缓冲液无效 (例如检测试剂结合封闭剂; 孔未完全封闭)	尝试不同的封闭剂和/或将封闭剂添加到洗涤缓冲液。
孵育/洗涤缓冲液的盐浓度	增加盐浓度可能会降低非特异性和/或减弱脱靶相互作用。
读板前加入终止液后时间太长	添加终止液后立即读板。
抗体出现非特异性结合	使用适当的封闭缓冲液, 例如 BSA 或 5-10% 正常血清, 如果是直标一抗, 使用与一抗种属相同的血清, 如果是非直标一抗, 则使用与二抗种属相同的血清。确保孔已经过预处理, 以防止非特异性附着。
高抗体浓度	尝试不同的稀释度, 以获得最优结果。
底物孵育在光下进行	底物孵育应避免光进行, 或根据试剂的实验方案建议进行。
底物加入后孔中有沉淀生成	增大样品的稀释倍数或降低底物浓度。
孔板脏	清洁孔板底部。
显色液变质或者试剂过期	检查试剂盒有效期, 在有效期内使用
孵育时间和温度的改变	按照说明书上推荐的时间和温度操作
盖板、容器或者枪头的重复使用	及时更换使用过的盖板, 容器或者枪头

灵敏度偏低

原因	解决方案
ELISA 试剂盒保存不当	按推荐方式保存所有试剂。请注意，各试剂的保存条件可能有所不同。
靶标不足	浓缩样品或降低样品稀释度。
检测试剂失活	确保报告酶/荧光素具有预期的活性。
酶标仪设置不正确	在检测中，确保酶标仪设置为正确的吸收波长或激发/发射波长。
测定方法不够灵敏	更换更灵敏的检测系统 (例如从比色检测转变为化学发光/荧光检测)。更换更灵敏的测定方法 (例如从直接 ELISA 方法转变为夹心 ELISA 方法)。延长孵育时间或升高温度。
微量滴定板吸附靶标的效果不佳	将靶标共价结合到微量滴定板。
底物不足	加入更多底物。
样品类型不兼容 (例如血清与细胞提取物)	对于没有验证过的样品种属，检测信号可能减弱或没有。使用验证过的样品类型作为阳性对照同时进行检测。
缓冲液或样品成分干扰	确认试剂中是否存在干扰性化合物。例如，抗体中的叠氮化钠会抑制 HRP 酶，在血浆中用作抗凝剂的 EDTA 会抑制酶反应。
混合或混用不同试剂盒的试剂	避免混合来自不同试剂盒的试剂。
试剂盒没有充分平衡	试剂室温平衡至少 20 分钟，确保所有试剂已平衡至室温。

