

AB-L182

Human TNF- α ELISA Kit



96T;48T

Order 021-34695924
orders@ab-mart.com
Support 400-6123-828
support1@ab-mart.com
Web www.ab-mart.com.cn

检测原理:

本试剂盒采用双抗体夹心酶联免疫吸附检测技术。特异性抗 **Human TNF- α** 抗体预包被在高亲和力的酶标板上。酶标板孔中加入标准品、待测样本和生物素化的检测抗体, 经过孵育, 样本中存在的 **Human TNF- α** 与固相抗体和检测抗体结合。洗涤去除未结合的物质后, 加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(Streptavidin-HRP)。洗涤后, 加入显色底物 TMB, 避光显色。颜色反应的深浅与样本中 **Human TNF- α** 的浓度成正比。加入终止液终止反应, 在 450 nm 波长(参考波长 570 - 630 nm)测定吸光度值。

样本采集与贮存:

1. 细胞培养上清

300 × g 离心 10 分钟去除沉淀物, 即刻检测, 或者分装, -20°C以下贮存。

2. 血清样本

离心管收集血清。血样凝集 30 分钟后, 1,000 × g 离心 10 分钟。吸取血清样本之后即刻检测, 或者分装, -20°C以下贮存。

3. 血浆样本

EDTA、枸橼酸钠或肝素抗凝收集血浆样本。1,000 × g 离心 30 分钟收集样本。即刻检测, 或者分装, -20°C以下贮存。本试剂盒可能适用于其它生物学样本。细胞培养上清、血清和血浆已经过验证。

试剂盒提供的材料:

组分	48T	96T
预包被酶标板	48T	96T
标准品	1 管	2 管
检测抗体	1 管	1 管
标准品稀释液	5 ml	5 ml
辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素	1 管	1 管
10×检测缓冲液	5ml	5 ml
显色底物 TMB	6 ml	11 ml
终止液	11 ml	11 ml
20×洗液	50 ml	50 ml
封板膜	6	6

自备材料:

1) 能够检测 450 nm 吸光度的酶标仪, 参考波长 570 nm 或 630 nm

- 2) 移液器及枪头、加样槽
- 3) 准备试剂用的试管、离心管、量筒等
- 4) 蒸馏水或去离子水
- 5) 涡旋振荡器、微孔板振荡器

试剂准备:

检测前请将所有的试剂、样本恢复至室温（18°C-28°C）。如果浓缩的试剂出现结晶，37°C温浴，直至结晶全部溶解。

1×洗液

吸取 20×浓缩洗液 50 ml 至 1 L 的量筒，加蒸馏水至 1,000 ml，轻轻混匀，避免泡沫。转移至干净瓶内。2 - 25°C贮存，1×洗液可稳定保存 30 天。

1×检测缓冲液

吸取 10×浓缩检测缓冲液 5 ml 至 100 ml 量筒，加蒸馏水至 50 ml，轻轻混匀，避免泡沫。2 - 8°C贮存，1×检测缓冲液可稳定保存 30 天。

试剂盒保存于 2 - 8°C，有效期标注于标签上。

技术要点:

- 1) 重溶或者混合蛋白的时候，始终避免气泡产生。
- 2) 避免交叉污染，在进行标准品加样、样本加样，以及不同试剂加样的时候，请更换枪头。不同的试剂，使用不同的加样槽。
- 3) 在应用自动洗板机时，加入洗液之后，设置 30 秒的浸泡程序，或者在不同的洗涤步骤将微孔板掉转 180 度，这样可以提高分析的准确度。
- 4) 为保证结果的精确性，孵育时封好封板膜。
- 5) 显色底物在添加之前应是无色的。保持显色底物始终处于避光态。
- 6) 终止液的添加顺序应与显色底物的添加顺序相同。

添加终止液之后，底物的颜色应由蓝色转变为黄色。如果底物呈现绿色，说明终止液与显色底物没有充分混匀。

7) 推荐所有的检测样本和标准品在检测中设复孔。

8) 在任何情况下，避免接触微孔板的内表面。

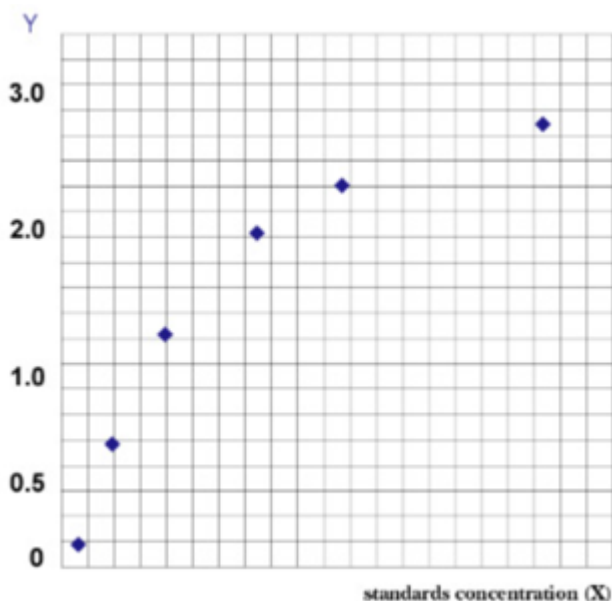
操作步骤:

检测之前请将所有的试剂、样本平衡至室温（18°C-28°C）。

- 1) 准备好所有需要的试剂及工作浓度标准品。
- 2) 将不需要的板条拆卸下来，放回装有干燥剂的铝箔袋，重新封好封口。

- 3) 浸泡酶标板：加入 300 μl 1 \times 洗液静置浸泡 30 秒。为了获得理想的实验结果浸泡是必须的。弃掉洗液之后，在吸水纸上将微孔板拍干。洗板完成之后，请立即使用微孔板，不要让微孔板干燥。
- 4) 加标准品：标准品孔加入 100 μl 2 倍比稀释的标准品。空白孔加入 100 μl 标准品稀释液(血清/血浆样本)或培养基(细胞培养上清样本)。
- 5) 加样本：血清/血浆：样本孔加入 50 μl 1 \times 检测缓冲液和 50 μl 样本。 细胞培养上清：样本孔加入 100 μl 细胞培养上清。
- 6) 加检测抗体：每孔加入 50 μl 稀释的检测抗体(1:100 稀释)。保证步骤 4、5、6 连续加样，不要间断。加样过程在 15 分钟内完成。
- 7) 孵育：使用封板膜封板。300 转/分钟振荡，室温（18 $^{\circ}\text{C}$ -28 $^{\circ}\text{C}$ ）孵育 2 小时。
- 8) 洗涤：弃掉液体，每孔加入 300 μl 洗液洗板，洗涤 6 次。每次洗板，在吸水纸上拍干。为获得理想的实验性能，必须彻底移除残留液体。
- 9) 加酶：每孔加入 100 μl 稀释的辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(1:100 稀释)。
- 10) 孵育：使用新的封板膜封板。300 转/分钟振荡，室温（18 $^{\circ}\text{C}$ -28 $^{\circ}\text{C}$ ）孵育 45 分钟。
- 11) 洗涤：重复步骤 8。
- 12) 加底物显色：每孔加入 100 μl 显色底物 TMB，避光，室温（18 $^{\circ}\text{C}$ -28 $^{\circ}\text{C}$ ）孵育 5 - 30 分钟。
- 13) 加终止液：每孔加入 100 μl 终止液。颜色由蓝色变为黄色。如果颜色呈现绿色或者颜色的变化明显不均匀，请轻轻叩击板框，充分混匀。
- 14) 检测读数：在 30 分钟之内，使用酶标仪进行双波长检测，测定 450 nm 最大吸收波长和 570 nm 或 630 nm 参考波长下的 OD 值。校准后的 OD 值为 450 nm 的测定值减去 570 nm 或 630 nm 的测定值。仅使用 450 nm 测定会导致 OD 值偏高，并且准确度降低。

结果计算：



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，大于等于 0.99；
- 2) 灵敏度：最低检测浓度小于

50pg/mL;

3) 特异性: 不与其他可溶性结构类似物交叉反应;

4) 重复性: 板内变异系数小于 10%、板间变异系数小于 15%;

5) 贮藏: 2-8°C, 避光防潮保存;

6) 有效期: 6 个月。

免责声明:

1) 试剂盒仅供研究使用, 不得用于临床实验或人体实验, 否则所产生的一切后果, 由实验者承担, 本公司概不负责;

2) 严格按照说明书操作, 实验者违反说明书操作, 后果由实验者承担。