

产品信息和操作指南

Rat TNF- α 预包被 ELISA kit

Cat# : DKW12-3720-048 / DKW12-3720-096

本试剂盒专用于科研，而非用于诊断

Rat TNF- α
DKW12-3720

目 录

产品简介.....	1
知识背景.....	1
试剂盒提供的试剂.....	2
需要实验者自行准备的试剂与仪器.....	2
注意事项.....	3
试剂的配制.....	5
操作过程.....	7
结果分析.....	9
试剂盒的保存.....	9
操作步骤一览表.....	10
参考文献.....	11
ELISA 测定中可能会出现的问题及解决方法.....	12
预包被 ELISA 试剂盒系列产品.....	15

1、 产品简介:

达优®大鼠 TNF- α ELISA 试剂盒是通过酶联免疫吸附技术,定量检测细胞培养上清液和大鼠血清、血浆和其他体液中天然和重组 TNF- α 的浓度。本试剂盒为预包被板,“夹心一步”完成,整个过程孵育时间不超过 2.5 小时,洗涤 8 次,操作时间大大减少。本试剂盒专用于科研,而非用于诊断。

使用前请仔细阅读说明书并检查试剂盒组分,若有任何疑问请与达科为生物工程有限公司联系, E-mail: RD@dakewe.com.

检测范围: 2000-31.3 pg/mL

灵敏度: 7.8 pg/mL

重复性: 板内、板间变异系数均 $<10\%$ 。

2、 知识背景:

肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor α , TNF- α) 亦称为恶质素,由活化的巨噬细胞和其它类型的细胞分泌,包括 T 细胞、B 细胞、NK 细胞、LAK 细胞、星形胶质细胞、内皮细胞、平滑肌细胞和一些肿瘤细胞(1-4),在正常宿主对抗感染和恶性肿瘤的生长过程中起重要的作用。其过量表达跟一系列的病理状态有关,包括恶病质、败血性休克和自身免疫失调。

3、 试剂盒提供的试剂：

试剂	规格	配制
Cytokine standard	2/1 瓶*	干粉状，按瓶上说明操作
Biotinylated antibody	2/1 瓶*	1: 100 用 Dilution buffer R (1×) 稀释
Streptavidin-HRP	2/1 瓶*	1: 100 用 Dilution buffer R (1×) 稀释
Dilution buffer R (1×)	3/2 瓶*	即用型
Washing buffer (50×)	1 瓶	1 : 50 用蒸馏水稀释
TMB	1 瓶	即用型
Stop solution	1 瓶	即用型
Precoated ELISA plate	8×12 或 8×6*	即用型
封板膜	2/1 张*	即用型
说明书	1 份	

*: 96/48 Tests

4、 需要实验者自行准备的试剂与仪器：

1. 酶标仪（建议参考仪器使用说明提前预热）
2. 微量加液器及吸头：P10，P50，P100，P200，P1000
3. 蒸馏水或去离子水
4. 全新滤纸
5. 旋涡振荡器和磁力搅拌器
6. 37℃温箱

5、 注意事项：

1. 试剂应按瓶上标签说明储存，使用前 **室温平衡** 20-30 分钟。
实验前室温平衡对 Washing buffer (50×)、Dilution buffer R (1×)、Precoated ELISA plate 和 TMB 有重要意义。
2. 冻干标准品冰上操作，按照标签说明溶解干粉，**充分混匀**，按照一次使用量分装，-20℃贮存，避免反复冻融。
3. 预包被板条使用前，请恢复到室温后再打开外包装袋，实验中不用的板条立即放回包装中，**密闭封口**，4℃可保存 1 个月。其余不用试剂应包装好或盖好。
4. Washing buffer (50×) 在 4℃保存可能有**结晶析出**，使用前务必使结晶完全溶解后（如加热、平衡温度后混匀等）再配置成 Washing buffer (1×) 工作液。
5. HRP 和检测抗体体积量很小，使用前请**高速短暂离心**管子，以使管壁或瓶盖的液体沉积到管底。
6. 实验操作中请使用一次性的吸头，避免交叉污染。
7. 使用前检查试剂盒内各种试剂；试剂稀释、加样和中止反应充分混匀或者摇匀对实验结果尤为重要，最好使用低速频率振荡器或者反应过程中每 15 分钟手工摇匀一次。
8. 实验板孔加入试剂的顺序应一致，以保证所有反应孔的孵育时间一致。
9. 使用洁净的塑料容器盛装洗涤液。

10. 洗涤过程中反应孔中残留的洗涤液应在**滤纸**上充分拍干，滤纸上看不到水印。勿将滤纸直接放入反应孔中吸水。
11. TMB 对光敏感，避免长时间暴露于光下，避免金属接触影响结果。**有毒，避免用手接触!** 准备使用的 TMB 若变为蓝色，表明 TMB 已经污染，请丢弃。请在终止反应后 10 分钟内读取 OD 值。
12. 请严格按照说明书标明的时间和温度进行孵育。冬季室内温度偏低，请使用**恒温箱或培养箱孵育**为好。
13. 试剂盒在保质期内使用，且不同批号试剂不要混用。
14. 2000 pg/mL 以上的结果为非线性的，根据此标准曲线无法得到精确的结果。大于 2000 pg/mL TNF- α 的样品应以 Dilution buffer R(1 \times)稀释后重做。在结果分析时，结合考虑相应的稀释度。
15. 特异性：不与大鼠其它细胞因子反应。

6、试剂的配制：

1. 提前 20 分钟将 **Washing buffer(50×)**和**即用溶液**从试剂盒中取出，以平衡至室温。
2. **Cytokine standard:** Standard 为冻干粉。先按标签说明将冻干粉溶解，静置 5-10 分钟，再用 **Dilution buffer R (1×)** 稀释到推荐检测浓度。标准品溶解后混匀，准确倍比稀释，严格操作非常重要。标准品的倍比稀释最好在进口的或者硅化的 EP 管中完成，减少非特异性吸附。在实验孔内进行倍比稀释时，注意操作规范，枪头勿刮划预包装的孔底。母液若没有用完请按照一次用量分装，-20℃保存。

* 推荐标准品浓度梯度为：2000 pg/mL、1000 pg/mL、500 pg/mL、250 pg/mL、125 pg/mL、62.5 pg/mL、31.3 pg/mL。
3. **Biotinylated antibody:** 1 : 100 用 **Dilution buffer R(1×)**稀释，混匀制成 **1×antibody** 工作液。
4. **Streptavidin-HRP :** 1 : 100 用 **Dilution buffer R(1×)**稀释，混匀制成 **1×HRP** 工作液。

5. **Washing buffer(50×):** 1 : 50 用蒸馏水稀释。
6. 即用型溶液
 - **Dilution buffer R(1×):** 用于稀释 **Biotinylated antibody**、**Streptavidin-HRP** 和 **Cytokine standard**。
 - **TMB**
 - **Stop solution**

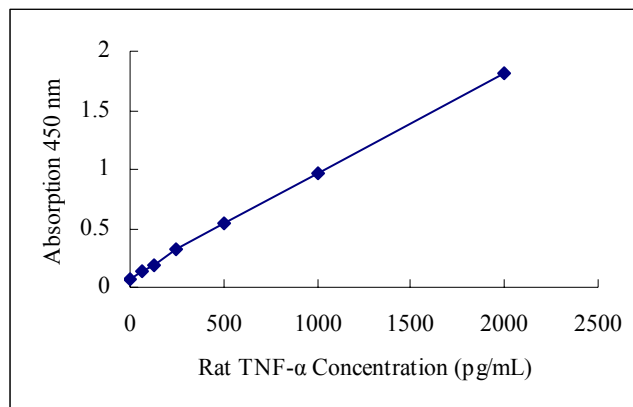
7、操作过程：

1. 使用前，将所有试剂充分混匀，避免产生泡沫。
2. 根据实验孔（空白和标准品）数量，确定所需的板条数目。
样品（含标准品）和空白都应做复孔。
3. 加样：100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加入稀释后的 Cytokine standard 至标准品孔，100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加入样品至样品孔，设置空白孔，用 Dilution buffer R (1 \times)代替样本和标准品。
4. 加检测抗体：50 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加入稀释后的 Biotinylated antibody。
混匀后，盖上封板膜，37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 90 分钟。
5. 洗板：扣去孔内液体，300 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加入 1 \times washing buffer；停留 1 分钟后弃去孔内液体。重复 4 次，最后一次在滤纸上扣干。
6. 加酶：100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加入稀释后的 Streptavidin-HRP。盖上封板膜，37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 分钟。
7. 洗板：重复步骤 5。
8. 显色：100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加入 TMB，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光温育 5-30 分钟之间，根据孔内颜色的深浅（深蓝色）来判定终止反应。通常显色 10-20 分钟可以达到很好的效果。
9. 终止反应：100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 迅速加入 Stop solution 终止反应。

10.读板：终止后 10 分钟内，用检测波长（measurement wavelength）450 nm 读值。推荐双波长即检测波长（measurement wavelength）450 nm、参考波长或校正波长（reference wavelength）610-630 nm 同时读板，测量结果会更准确。

8、结果分析：

1. 有两种设定空白对照的方案：
 - 1) 将 TMB 空白显色孔设为对照。所有的标准品和样品的吸光值减去空白孔的吸光值后，在坐标纸上画出曲线，以吸光值作为纵坐标，以浓度作为横坐标。
 - 2) 将零孔设为对照。得到的数据可以直接在坐标纸上画出曲线。
2. 根据样品的吸光值在坐标上找出对应的浓度。用户也可以使用各种应用软件来计算。若样品 OD 值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测，计算浓度时应乘以稀释倍数。



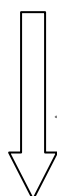
注意：本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线来计算标本含量。

9、试剂盒的保存：

4°C 可稳定保存 6 个月。

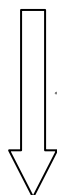
10、操作步骤一览表：

加样品或配好的标准品，设置对照，**100 μ L/well**



无需温育，直接进行下一步操作

加生物素标记的抗体，**50 μ L/well**，混匀



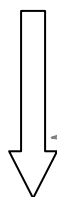
37 $^{\circ}$ C 温育 90 分钟；
洗 4 次

加亲和素-**HRP** 标记物，**100 μ L/well**



37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟；
洗 4 次

加 **TMB** 显色液，**100 μ L/well**



37 $^{\circ}$ C 显色 5-30 分钟

加 **Stop solution** **100 μ L/well**，终止反应



10 分钟内读板

在 $\lambda=450\text{ nm}$ 处读取吸光值

11、参考文献

- (1) Vilcek J. and T.H. Lee. (1991) *J. Biol. Chem.* 266:7313.
- (2) Ruddle, N.H. (1992) *Curr. Opinion Immunol.* 4:327.
- (3) Tumor Necrosis Factor: Structure, Function and Mechanism of Action, Aggarwal, B.B. and J. Vilcek eds. (1991) Marcel Dekker, Inc., New York.
- (4) Beutler, B. and A. Cerami. (1989) *Annu. Rev. Immunol.* 7:625.
- (5) 曾洁 等. 武汉大学学报(医学版). 2007, 28(1): 77-80.
- (6) 赵中夫 等. 胃肠病学和肝病杂志. 2008,17,500-502.
- (7) 车德才 等. 中国比较医学杂志. 2007,17,373-376.
- (8) 郭丽丽 等. 中国免疫学杂志. 2002, 18(3):197-200

12、ELISA 测定中可能会出现的问题及解决方法

问 题	可能的原因	解决方法
1. 非常弱 的结果	(1) 温育的时间或温度不够； (2) 显色反应时间太短； (3) 所用配制缓冲液的蒸馏水有问题； (4) 加入抗体/酶的稀释液浓度太低； (5) 酶标仪滤光片不正确； (6) 不正确的试剂储存方式； (7) 试剂盒没有充分平衡； (8) 移液器吸液量不足，吸嘴内壁挂水太多或内壁不清洁。	a. 校正温育箱温度； b. 校正定时钟准确定时； c. 使用新鲜合格的蒸馏水； d. 按照说明书保存试剂盒和准确配制工作液； e. 试剂室温平衡至少 20 分钟，确保所有试剂已平衡至室温（约 25℃）； f. 校正移液器，吸嘴要配套，装吸嘴时要紧密，吸嘴内壁要清洁，最好一次性使用。

<p>2. 标准曲线和测定的重复性差</p>	<p>这是典型的由测定操作引起的问题，包括</p> <ul style="list-style-type: none"> (1) 加样本及试剂量不准；孔间不一致； (2) 加样过快，孔间发生污染； (3) 加错样本； (4) 加样本及试剂时，加在孔壁上部非包被区； (5) 不同批号试剂盒中组分混用； (6) 温育时间、洗板、显色时间不一致； (7) 孔内污染杂物； (8) 酶标仪滤光片不正确； (9) 试剂/样品没有混匀； (10) 血清标本未完全凝固即加入，反应孔内出现纤维蛋白凝固或残留血细胞，易出现假阳性反应等。 	<ul style="list-style-type: none"> a. 重复某一样品时，加样时间尽可能与第一次接近； b. 重复测定标本，操作条件、人员等应尽可能与上次保持一致，以排除这些因素造成的不一致的可能性； c. 样品稀释前应充分混匀； d. 尽可能使用同一移液器并装紧吸嘴。
<p>3. 白板 (阳性对照不显色)</p>	<ul style="list-style-type: none"> (1) 漏加酶结合物； (2) 洗板液配制中出现问题，如量筒不干净，含酶抑制物（如叠氮钠）等； (3) 添加的试剂错误或者被遗漏； (4) 试剂过期； 	<ul style="list-style-type: none"> a. 请按说明书所示稀释倍数配制； b. 注意不要漏加； c. 每次加液前均应核对标签。

<p>4. 空白背景高</p>	<p>(1) 洗板不干净; (2) 显色液变质; (3) 试剂过期; (4) 不正确的试剂稀释液, 如加酶的浓度过高; (5) 蒸馏水受酶等污染; (6) 试剂混用; (7) 培养箱温度超过 37°C 或反应时间过长。</p>	<p>a. 浓缩洗液准确配制; b. 50 倍浓缩洗涤液如有结晶则应让结晶于室温全部溶解后再量取稀释; c. 充分洗涤, 彻底拍干; d. 加样或加酶拍板的滤纸应弃去不用, 不要反复使用, 否则易造成污染; e. 吸嘴尽可能一次性使用; f. 使用新鲜蒸馏水; g. 不同批号试剂勿混用; h. 请按说明书所示稀释倍数配制; i. 显色反应时间适当缩短。</p>
-----------------	---	---

13、预包被 ELISA 试剂盒系列产品

达优®小鼠 ELISA 试剂盒

DKW12-2000-048	Mouse IFN- γ ELISA kit (预包被减步法)	48T
DKW12-2000-096		96T
DKW12-2011-048	Mouse IL-1 α ELISA kit (预包被减步法)	48T
DKW12-2011-096		96T
DKW12-2012-048	Mouse IL-1 β ELISA kit (预包被减步法)	48T
DKW12-2012-096		96T
DKW12-2020-048	Mouse IL-2 ELISA kit (预包被减步法)	48T
DKW12-2020-096		96T
DKW12-2040-048	Mouse IL-4 ELISA kit (预包被减步法)	48T
DKW12-2040-096		96T
DKW12-2050-048	Mouse IL-5 ELISA kit (预包被减步法)	48T
DKW12-2050-096		96T
DKW12-2060-048	Mouse IL-6 ELISA kit (预包被减步法)	48T
DKW12-2060-096		96T
DKW12-2100-048	Mouse IL-10 ELISA kit (预包被减步法)	48T
DKW12-2100-096		96T
DKW12-2120-048	Mouse IL-12 p70 ELISA kit (预包被减步法)	48T
DKW12-2120-096		96T
DKW12-2123-048	Mouse IL-12/IL-23 p40 ELISA kit (预包被减步法)	48T
DKW12-2123-096		96T
DKW12-2170-048	Mouse IL-17A ELISA kit (预包被减步法)	48T
DKW12-2170-096		96T
DKW12-2220-048	Mouse IL-22 ELISA kit (预包被)	48T
DKW12-2220-096		96T
DKW12-2710-048	Mouse TGF- β 1 ELISA kit (预包被)	48T
DKW12-2710-096		96T
DKW12-2720-048	Mouse TNF- α ELISA kit (预包被减步法)	48T
DKW12-2720-096		96T
DKW12-2734-048	Mouse VEGF-A ELISA kit (预包被)	48T
DKW12-2734-096		96T
DKW12-2820-048	Mouse IgE ELISA kit (预包被)	48T
DKW12-2820-096		96T
DKW12-2739-048	Mouse MCP-1 ELISA kit (预包被)	48T
DKW12-2739-096		96T

达优[®]人 ELISA 试剂盒

DKW12-1000-048	Human IFN- γ ELISA Kit (预包被减步法)	48T
DKW12-1000-096		96T
DKW12-1012-048	Human IL-1 β ELISA Kit (预包被减步法)	48T
DKW12-1012-096		96T
DKW12-1020-048	Human IL-2 ELISA Kit (预包被减步法)	48T
DKW12-1020-096		96T
DKW12-1040-048	Human IL-4 ELISA Kit (预包被)	48T
DKW12-1040-096		96T
DKW12-1050-048	Human IL-5 ELISA Kit (预包被减步法)	48T
DKW12-1050-096		96T
DKW12-1060-048	Human IL-6 ELISA Kit (预包被减步法)	48T
DKW12-1060-096		96T
DKW12-1080-048	Human IL-8 ELISA Kit (预包被减步法)	48T
DKW12-1080-096		96T
DKW12-1100-048	Human IL-10 ELISA Kit (预包被减步法)	48T
DKW12-1100-096		96T
DKW12-1120-048	Human IL-12p70 ELISA Kit (预包被减步法)	48T
DKW12-1120-096		96T
DKW12-1170-048	Human IL-17A ELISA Kit (预包被)	48T
DKW12-1170-096		96T
DKW12-1220-048	Human IL-22 ELISA Kit (预包被减步法)	48T
DKW12-1220-096		96T
DKW12-1325-048	Human sIL-2R ELISA Kit (预包被减步法)	48T
DKW12-1325-096		96T
DKW12-1354-048	Human CD54/sICAM-1 ELISA Kit (预包被减步法)	48T
DKW12-1354-096		96T
DKW12-1406-048	Human CD106/sVCAM-1 ELISA Kit (预包被)	48T
DKW12-1406-096		96T

DKW12-1530-048	Human Adiponectin/Acrp30 ELISA Kit (预包被)	48T
DKW12-1530-096		96T
DKW12-1540-048	Human CRP ELISA Kit (预包被)	48T
DKW12-1540-096		96T
DKW12-1710-048	Human TGF- β 1 ELISA Kit (预包被)	48T
DKW12-1710-096		96T
DKW12-1720-048	Human TNF- α ELISA Kit (预包被减步法)	48T
DKW12-1720-096		96T
DKW12-1730-048	Human GM-CSF ELISA Kit (预包被)	48T
DKW12-1730-096		96T
DKW12-1731-048	Human G-CSF ELISA Kit (预包被)	48T
DKW12-1731-096		96T
DKW12-1732-048	Human EGF ELISA Kit (预包被)	48T
DKW12-1732-096		96T
DKW12-1734-048	Human VEGF-A ELISA Kit (预包被)	48T
DKW12-1734-096		96T
DKW12-1739-048	Human MCP-1 ELISA Kit (预包被)	48T
DKW12-1739-096		96T
DKW12-1741-048	Human MIP-1 α ELISA Kit (预包被)	48T
DKW12-1741-096		96T
DKW12-1760-048	Human FGF basic ELISA Kit (预包被)	48T
DKW12-1760-096		96T
DKW12-1763-048	Human β -NGF ELISA Kit (预包被)	48T
DKW12-1763-096		96T
DKW12-1765-048	Human HGF ELISA Kit (预包被)	48T
DKW12-1765-096		96T
DKW12-1820-048	Human IgE ELISA Kit (预包被)	48T
DKW12-1820-096		96T
DKW12-1830-048	Human perforin ELISA Kit (预包被)	48T
DKW12-1830-096		96T

达优®大鼠 ELISA 试剂盒

DKW12-3000-048	Rat IFN- γ ELISA kit (预包被减步法)	48T
DKW12-3000-096		96T
DKW12-3012-048	Rat IL-1 β ELISA kit (预包被)	48T
DKW12-3012-096		96T
DKW12-3020-048	Rat IL-2 ELISA kit (预包被减步法)	48T
DKW12-3020-096		96T
DKW12-3040-048	Rat IL-4 ELISA kit (预包被)	48T
DKW12-3040-096		96T
DKW12-3060-048	Rat IL-6 ELISA kit (预包被)	48T
DKW12-3060-096		96T
DKW12-3100-048	Rat IL-10 ELISA kit (预包被减步法)	48T
DKW12-3100-096		96T
DKW12-3170-048	Rat IL-17A ELISA kit (预包被)	48T
DKW12-3170-096		96T
DKW12-3710-048	Rat TGF- β 1 ELISA kit (预包被)	48T
DKW12-3710-096		96T
DKW12-3720-048	Rat TNF- α ELISA Kit (预包被减步法)	48T
DKW12-3720-096		96T

ELISA 辅助试剂

DKW12-T010	TMB (ready-to-use, 即用型), 1 plate	10 mL
DKW-F1	ELISA 辅助试剂盒	96T

深圳市达科为生物工程有限公司
Dakewe Bioengineering Co., LTD
 (130101)