

# 大鼠肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) 酶联免疫分析

## 试剂盒使用说明书

本试剂盒仅供研究使用。

### 检测范围:

96T

10ng/L-360ng/L

### 使用目的:

本试剂盒用于测定大鼠盥洗液样本中肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 含量。

### 实验原理

本试剂盒应用双抗体夹心法测定标本中大鼠肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 水平。用纯化的大鼠肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 抗体包被微孔板, 制成固相抗体, 往包被单抗的微孔中依次加入肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), 再与 HRP 标记的肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 抗体结合, 形成抗体-抗原-酶标抗体复合物, 经过彻底洗涤后加底物 TMB 显色。TMB 在 HRP 酶的催化下转化成蓝色, 并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度 (OD 值), 通过标准曲线计算样品中大鼠肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 浓度。

### 试剂盒组成

1	30 倍浓缩洗涤液	20ml×1 瓶	7	终止液	6ml×1 瓶
2	酶标试剂	6ml×1 瓶	8	标准品 (720ng/L)	0.5ml×1 瓶
3	酶标包被板	12 孔×8 条	9	标准品稀释液	1.5ml×1 瓶
4	样品稀释液	6ml×1 瓶	10	说明书	1 份
5	显色剂 A 液	6ml×1 瓶	11	封板膜	2 张
6	显色剂 B 液	6ml×1/瓶	12	密封袋	1 个

### 标本要求

1. 标本采集后尽早进行提取, 提取按相关文献进行, 提取后应尽快进行实验。若不能马上进行试验, 可将标本放于-20℃保存, 但应避免反复冻融
2. 不能检测含 NaN<sub>3</sub> 的样品, 因 NaN<sub>3</sub> 抑制辣根过氧化物酶的 (HRP) 活性。

### 操作步骤

1. 标准品的稀释: 本试剂盒提供原倍标准品一支, 用户可按照下列图表在小试管中进行稀释。

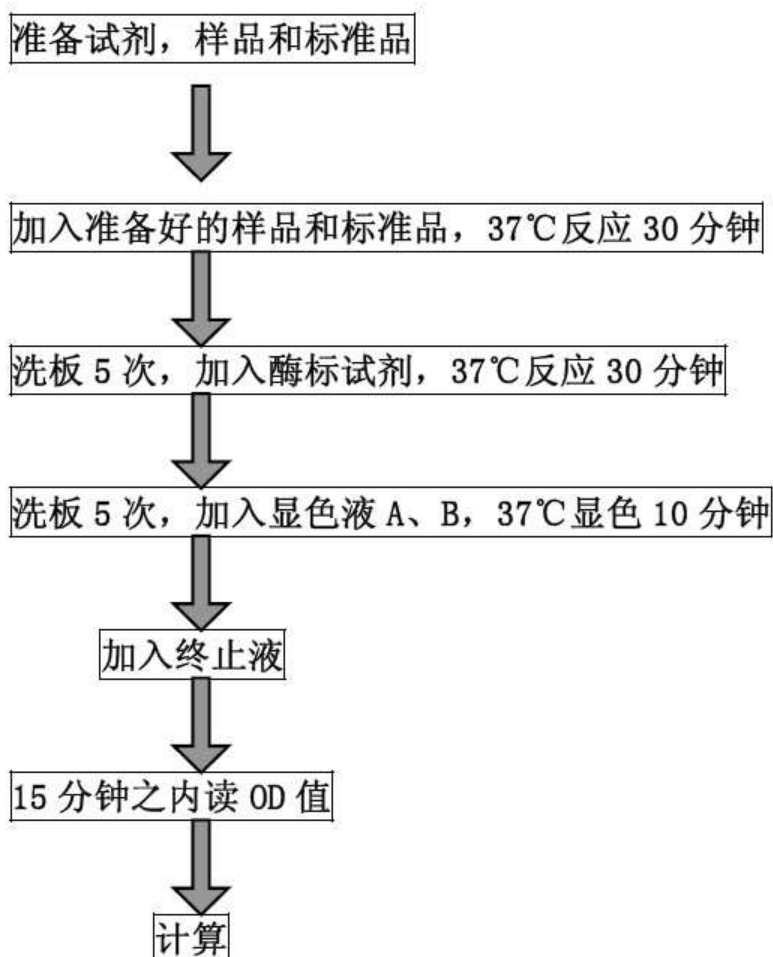
360ng/L	5 号标准品	150 $\mu$ l 的原倍标准品加入 150 $\mu$ l 标准品稀释液
180ng/L	4 号标准品	150 $\mu$ l 的 5 号标准品加入 150 $\mu$ l 标准品稀释液
90ng/L	3 号标准品	150 $\mu$ l 的 4 号标准品加入 150 $\mu$ l 标准品稀释液
45ng/L	2 号标准品	150 $\mu$ l 的 3 号标准品加入 150 $\mu$ l 标准品稀释液
22.5ng/L	1 号标准品	150 $\mu$ l 的 2 号标准品加入 150 $\mu$ l 标准品稀释液

2. 加样: 分别设空白孔 (空白对照孔不加样品及酶标试剂, 其余各步操作相同)、标准孔、

待测样品孔。在酶标包被板上标准品准确加样 50 $\mu$ l, 待测样品孔中先加样品稀释液 40 $\mu$ l, 然后再加待测样品 10 $\mu$ l (样品最终稀释度为 5 倍)。加样将样品加于酶标板孔底部, 尽量不触及孔壁, 轻轻晃动混匀。

3. 温育: 用封板膜封板后置 37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟。
4. 配液: 将 30 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 30 倍稀释后备用
5. 洗涤: 小心揭掉封板膜, 弃去液体, 甩干, 每孔加满洗涤液, 静置 30 秒后弃去, 如此重复 5 次, 拍干。
6. 加酶: 每孔加入酶标试剂 50 $\mu$ l, 空白孔除外。
7. 温育: 操作同 3。
8. 洗涤: 操作同 5。
9. 显色: 每孔先加入显色剂 A 50 $\mu$ l, 再加入显色剂 B 50 $\mu$ l, 轻轻震荡混匀, 37 $^{\circ}$ C 避光显色 10 分钟。
10. 终止: 每孔加终止液 50 $\mu$ l, 终止反应 (此时蓝色立转黄色)。
11. 测定: 以空白空调零, 450nm 波长依序测量各孔的吸光度 (OD 值)。测定应在加终止液后 15 分钟以内进行。

#### 操作程序总结:



#### 计算

以标准物的浓度为横坐标, OD 值为纵坐标, 在坐标纸上绘出标准曲线, 根据样品的 OD 值由标准曲线查出相应的浓度; 再乘以稀释倍数; 或用标准物的浓度与 OD 值计算出标

准曲线的直线回归方程式，将样品的 OD 值代入方程式，计算出样品浓度，再乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。

#### **注意事项**

1. 试剂盒从冷藏环境中取出应在室温平衡 15-30 分钟后方可使用，酶标包被板开封后如未用完，板条应装入密封袋中保存。
2. 浓洗涤液可能会有结晶析出，稀释时可在水浴中加温助溶，洗涤时不影响结果。
3. 各步加样均应使用加样器，并经常校对其准确性，以避免试验误差。一次加样时间最好控制在 5 分钟内，如标本数量多，推荐使用排枪加样。
4. 请每次测定的同时做标准曲线，最好做复孔。如标本中待测物质含量过高（样本 OD 值大于标准品孔第一孔的 OD 值），请先用样品稀释液稀释一定倍数（n 倍）后再测定，计算时请最后乘以总稀释倍数（ $\times n \times 5$ ）。
5. 封板膜只限一次性使用，以避免交叉污染。
6. 底物请避光保存。
7. 严格按照说明书的操作进行，试验结果判定必须以酶标仪读数为准。
8. 所有样品，洗涤液和各种废弃物都应按传染物处理。
9. 本试剂不同批号组分不得混用。

#### **保存条件及有效期**

1. 试剂盒保存：； 2-8℃。
2. 有效期： 6 个月