 酶联免疫吸附测试 *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

**羊肿瘤坏死因子α（TNF-α）酶联免疫分析(ELISA)**

**试剂盒使用说明书**

**本试剂仅供研究使用**

**实验目的：**

本试剂盒用于测定大鼠血清、血浆、组织匀浆及相关液体样本中肿瘤坏死因子α（TNF-α）的含量。

**实验原理：**

本试剂盒应用双抗体夹心法测定标本中羊肿瘤坏死因子α（TNF-α）水平。用纯化的羊肿瘤坏死因子α（TNF-α）捕获抗体包被微孔板，制成固相抗体，往包被的微孔中依次加入羊肿瘤坏死因子α（TNF-α），再与HRP标记的检测抗体结合，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羊肿瘤坏死因子α（TNF-α）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羊肿瘤坏死因子α（TNF-α）含量。

**试剂盒组成**：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **试剂盒组成** | **48孔配置** | **96孔配置** | **保存** |
| 说明书 | 1份 | 1份 |  |
| 封板膜 | 2片 | 2片 |  |
| 密封袋 | 1个 | 1个 |  |
| 酶标包被板 | 1×48 | 1×96 | 2-8℃保存 |
| 标准品 | 0.3ml×6管 | 0.3ml×6管 | 2-8℃保存 |
| 酶标试剂 | 5 ml×1瓶 | 10 ml×1瓶 | 2-8℃保存 |
| 样品稀释液 | 3 ml×1瓶 | 6 ml×1瓶 | 2-8℃保存 |
| 显色剂A液 | 3 ml×1瓶 | 6 ml×1瓶 | 2-8℃保存 |
| 显色剂B液 | 3 ml×1瓶 | 6 ml×1瓶 | 2-8℃保存 |
| 终止液 | 3 ml×1瓶 | 6 ml×1瓶 | 2-8℃保存 |
| 20×浓缩洗涤液 | 15ml×1瓶 | 25ml×1瓶 | 2-8℃保存 |

注：标准品浓度依次为：200、100、 50、25、12.5、0 pg/mL.

**样本处理及要求**：

1. 血清：室温血液自然凝固10-20分钟，离心20分钟左右（2000-3000转/分）。仔细收集上清，保存过程中如出现沉淀，应再次离心。

2. 血浆：应根据标本的要求选择EDTA或柠檬酸钠作为抗凝剂，混合10-20分钟后，离心20分钟左右（2000-3000转/分）。仔细收集上清，保存过程中如有沉淀形成，应该再次离心。

3. 尿液：用无菌管收集，离心20分钟左右（2000-3000转/分）。仔细收集上清，保存过程中如有沉淀形成，应再次离心。胸腹水、脑脊液参照实行。

4. 细胞培养上清：检测分泌性的成份时，用无菌管收集。离心20分钟左右（2000-3000转/分）。仔细收集上清。检测细胞内的成份时，用PBS（PH7.2-7.4）稀释细胞悬液，细胞浓度达到100万/ml左右。通过反复冻融，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。保存过程中如有沉淀形成，应再次离心。

5. 组织标本：切割标本后，称取重量。加入一定量的PBS，PH7.4。用液氮迅速冷冻保存备用。标本融化后仍然保持2-8℃的温度。加入一定量的PBS（PH7.4），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）。仔细收集上清。分装后一份待检测，其余冷冻备用。

6. 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.

7. 不能检测含NaN3的样品，因NaN3抑制辣根过氧化物酶的（HRP）活性。

**操作步骤**

1. 标准品的加样：设置标准品孔和样本孔，标准品孔各加不同浓度的标准品50μL；。

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）、待测样品孔。在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液40μl，然后再加待测样品10μl（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. 加酶：每孔加入酶标试剂100μl，空白孔除外。

4. 温育：用封板膜封板后置37℃温育60分钟。

5. 配液：将20倍浓缩洗涤液用蒸馏水20倍稀释后备用。

6. 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。

7. 显色：每孔先加入显色剂A50μl，再加入显色剂B50μl，轻轻震荡混匀，37℃避光显色15分钟.

8. 终止：每孔加终止液50μl，终止反应（此时蓝色立转黄色）。

9. 测定：以空白孔调零，450nm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。

**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。

（此图仅供参考）

**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。样本在使用前也要在室温平衡60分钟。

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（×n×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。

**技术提示：**

1、混合蛋白溶液时，避免起泡。

2、加校准品与样本时，每个校准品浓度和样本都要更换移液枪头，公共组分应该悬臂加样，避免交叉污染。

3、合适的温育时间，和充分的洗涤步骤，是保证实验结果准确性的必要条件。

4、底物溶液为无色液体，保存过程中变为蓝色，代表底物溶液已经失效，不得使用。

5、终止液加样顺序与底物溶液加样顺序一致，加入终止液后，蓝色底物产物，会瞬间变为黄色。

6、实验中，用剩的板条，应立即放回自封袋中，密封（低温干燥）保存。

7、所有液体组分，使用前充分摇匀，严格按照说明书标明的时间、加样量及加样顺序进行温育操作。

8、检测必须符合实验室管理规范的规定，严格防止交叉污染，所有样品、洗弃液和各种废弃物都应按照传染物进行处置。

**试剂盒性能：**

1. 样品线性回归与预期浓度相关系数R值为0.95以上。

2. 批内变异系数与批间变异系数应分别小于10%和15% 。

**检测范围：**

6.25 pg/mL – 200 pg/mL

**灵敏度：**

最低检测浓度小于1 pg/mL

**保存条件及有效期：**

1. 试剂盒保存： 2-8℃。

2．有效期： 6个月

武汉吉立德生物科技有限公司 官网：www.giled.cn

电话：400-027-1626 13163358390（微信同号） QQ ：34636662