

货号 S0C3023 – Mouse TNF-α 一步法 ELISA 试剂盒

用于血清，血浆和细胞培养上清中 Mouse TNF-α 的定量测定

本产品仅用于科学研究，不能用于临床诊断

Version v1a

储存条件及有效期: 收到后请立即将试剂盒储存在 2-8°C。开封后试剂盒各组分建议有效期：酶标板 2～8°C 为 1 个月（未使用的板条拆下来后请及时放回铝箔袋内并封好封口）；标准品溶解后当天有效；其它组分开瓶后在 2-8°C 保存不影响有效期。

试剂盒组分

Item	Quantity	Storage Condition
Mouse TNF-α Capture Antibody 10X	600 μL	2-8°C
Mouse TNF-α Detector Antibody 10X	600 μL	2-8°C
Mouse TNF-α Lyophilized Recombinant Protein	2 Vials	2-8°C
Assay Diluent #1	50 mL	2-8°C
Wash Buffer 10X	20 mL	2-8°C
TMB Solution	12 mL	2-8°C
Stop Solution	12 mL	2-8°C
OneStep Pre-Coated 96-Well H-Microplate	12 x 8 well strips	2-8°C
Plate Seal	2	2-8°C

用户需自备材料，试剂盒未提供

能够测量吸光度 450nm 或 650nm 的酶标仪

酶标板恒温振荡器

多通道和单通道移液器

去离子水

离心管或稀释板

试剂配制

使用前请先将所有试剂恢复到室温。本试剂盒包含一个 96 孔板所需要的试剂量。

1X Wash Buffer:

用去离子水稀释 10X Wash Buffer，制备 1X Wash Buffer。将 10ml 10X Wash Buffer 与 90ml 去离子水混合制成 100ml 1X Wash Buffer，轻柔搅拌均匀。

注意：10X Wash Buffer 在 2-8°C 储存时可能有结晶析出，为正常现象，恢复室温后结晶会完全溶解。请等至结晶完全溶解后在用去离子水稀释。

Antibody Cocktail:

用 Assay Diluent #1 稀释 Capture Antibody 和 Detector Antibody，制备抗体对混合液。将 500μL 10X Capture Antibody 和 500μL 10X Detector Antibody 与 4 mL Assay Diluent #1 混合均匀，即配制成 5ml 抗体对混合液。

标准品配制

每次实验都要配制一组新的标准品。

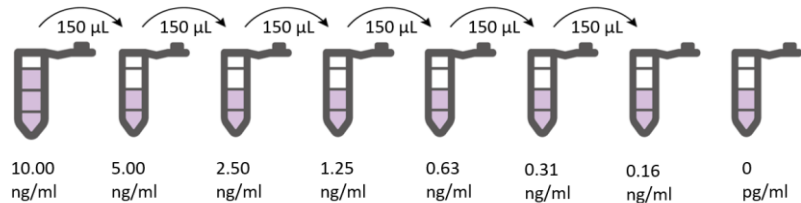
冻干的标准品粉末溶解后为标准品母液，仅限当天使用。

标准品工作液现配现用，建议工作液配好后一小时内使用，超过一小时需要重新配制。

下面描述了本试剂盒推荐的标准曲线的配制过程。

重要信息: 每管的标准品粉末的标识质量及重溶体积标注于标准品的标签上，开盖前短暂离心后加入管子标签所标识体积的稀释溶液溶解即为 Mouse TNF-α 标准品母液。在室温下充分溶解 10 分钟，并轻轻混合。这是 10 ng/mL 标准品母液。

- 用记号笔标记 8 个离心管或稀释板中的一列（8 孔），分别为标准品工作液 1–8。
- 在 1 号管/孔中直接加入**溶解好的标准品**，在 2-8 号管/孔中加入 **150 μL Assay Diluent #1**。
- 使用标准品母液按照下图配制标准品梯度。标准品#8 为空白对照；



样品准备

血浆:

常规抗凝剂处理后收集血浆，将样品在 2000 x g 下离心 10 分钟。离心后的血浆样品用 Assay Diluent #1 稀释后进行上样。未稀释的血浆样品请在 -20°C 或更低温度下保存 3 个月。避免重复冻融循环。

血清:

样本应收集到血清分离管中。凝块形成后，2000 x g 离心 10 分钟，收集血清，血清样品用 Assay Diluent #1 稀释后进行上样。未稀释的血清样品请在 -20°C 或更低温度下保存 3 个月。避免重复冻融循环。

细胞或组织培养上清:

将细胞或组织培养上清在 2000 x g 下离心 10 分钟，去除碎片。收集上清液后可直接上样或用 Assay Diluent #1 稀释后进行上样。在 -20°C 或以下保存未稀释的样品。避免重复冻融循环。

酶标板准备

96 孔可拆卸的酶标板为即用型，可以直接上样，不需要其他处理。板型为 12 条 1 x 8 板条。

未使用的板条应立即返回到含有干燥剂包装的箔袋中，重新密封并在 2-8°C 下保存。

使用前将需要所有材料和试剂平衡至室温。

- 1) 按照上页的说明准备所有试剂、工作标准品和样品。
- 2) 从可拆卸的板框上去除多余的酶标板条，将其放回含有干燥剂包装的箔袋中，重新密封并返回 2-8°C 储存。
- 3) 取 50μL 样品或标准品加到相应的孔中。
- 4) 每孔中加入 50μL 抗体对混合液。
- 5) 贴上封板膜，在设置条件为“转速 500 转/分钟和温度 25°C”的酶标板恒温振荡器上孵育 45 分钟。
- 6) 用 300μL 1X Wash Buffer 清洗每个孔，清洗三次。最后一次洗涤后，把板子倒过来，在干净的纸巾上轻轻拍打数次，以去除多余的液体。
- 7) 每孔加入 100μL TMB 底物，在 500 转/分的酶标板恒温振荡器上避光显色 10 分钟。
鉴于实验室环境条件的可变性，最佳显色时间可能在 5 至 15 分钟之间变化。注：加入终止液后，颜色由蓝色变为黄色，信号强度增强约 3 倍。为避免信号饱和，加入终止液前可以预读一下酶标板，在标准品的高浓度达到蓝色 O.D.₆₅₀ = 1.0 之前进行下一步操作。
- 8) 每孔加入 100μL 终止液，充分混匀后在 30 分钟内测定每个孔的 OD₄₅₀，使用设置为 450 nm 的酶标仪。如果有波长校正，请设置为 540nm 或 570nm，校准后的 OD 值为 450 nm 的测定值减去 540 nm 或 570 nm 的测定值。

取每个标准品和样品的重复读数的平均值，然后减去空白对照平均读值。

通过使用能够生成四参数逻辑(4-PL)曲线拟合的计算机软件创建标准曲线和换算样本浓度。

如果样品被稀释后再上样，从标准曲线上换算出的浓度必须在乘以稀释倍数才是样本的实际浓度。

Figure 1 is a log-log plot showing the dose-response curve for the detection of mouse TNF-α. The x-axis represents the concentration of Mouse TNF-α in ng/ml, ranging from 0.1 to 100. The y-axis represents the optical density (O.D.) at 450 nm, ranging from 0.01 to 10. The curve shows a linear relationship on the log-log scale, indicating a sigmoidal binding curve. Data points are plotted at approximately (0.2, 0.03), (0.4, 0.06), (0.7, 0.1), (1.2, 0.18), (2.5, 0.35), (5.0, 0.65), and (10.0, 1.5).

[illegible]