

## 肿瘤坏死因子相关激活诱导因子测定试剂盒说明书

### 试验盒原理:

ES 试剂盒是固相夹心法酶联免疫吸附实验 (ELISA) . 已知 ES 浓度的标准品、未知浓度的样品加入微孔酶标板内进行检测。先将 ES 和生物素标记的抗体同时温育。洗涤后, 加入亲和素标记过的 HRP。再经过温育和洗涤, 去除未结合的酶结合物, 然后加入底物 A、B, 和酶结合物同时作用。产生颜色。颜色的深浅和样品中 ES 的浓度呈比例关系。

### 试剂盒性能:

1. 灵敏度: 最小的检测浓度小于 1 号标准品。稀释度的线性。样品线性回归与预期浓度相关系数 R 值为 0.990。
2. 特异性: 不与其他细胞因子反应。
3. 重复性: 板内、板间变异系数均小于 10%。

### 操作步骤:

1. 使用前, 将所有试剂充分混匀。不要使液体产生大量的泡沫, 以免加样时加入大量的气泡, 产生加样上的误差。
  2. 根据待测样品数量加上标准品的数量决定所需的板条数。每个标准品和空白孔建议做复孔。每个样品根据自己的数量来定, 能使用复孔的尽量做复孔。标本用标本稀释液 1: 1 稀释后加入 50ul 于反应孔内。
  3. 加入稀释好后的标准品 50ul 于反应孔、加入待测样品 50ul 于反应孔内。立即加入 50ul 的生物素标记的抗体。盖上膜板, 轻轻振荡混匀, 37℃ 温育 1 小时。
  4. 甩去孔内液体, 每孔加满洗涤液, 振荡 30 秒, 甩去洗涤液, 用吸水纸拍干。重复此操作 3 次。如果用洗板机洗涤, 洗涤次数增加一次。
  5. 每孔加入 80ul 的亲和链酶素-HRP, 轻轻振荡混匀, 37℃ 温育 30 分钟。
  6. 甩去孔内液体, 每孔加满洗涤液, 振荡 30 秒, 甩去洗涤液, 用吸水纸拍干。重复此操作 3 次。如果用洗板机洗涤, 洗涤次数增加一次。
  7. 每孔加入底物 A、B 各 50ul, 轻轻振荡混匀, 37℃ 温育 10 分钟。避免光照。
  8. 取出酶标板, 迅速加入 50ul 终止液, 加入终止液后应立即测定结果。
  9. 在 450nm 波长处测定各孔的 OD 值。
- 4、敏感度: 0.1 pg/ml。

### 结果判断与分析:

- 1、仪器值: 于波长 450nm 的酶标仪上读取各孔的 OD 值
- 2、以吸光度 OD 值为纵坐标 (Y), 相应的 ES 标准品浓度为横坐标 (X), 做得相应的曲线, 样品的 ES 含量可根据其 OD 值由标准曲线换算出相应的浓度。
- 3、检测值范围: 0-240pg/ml

### 操作注意事项:

1. 试剂应按标签说明书储存, 使用前恢复到室温。稀稀过后的标准品应丢弃, 不可保存。
2. 实验中不用的板条应立即放回包装袋中, 密封保存, 以免变质。
3. 不用的其它试剂应包装好或盖好。不同批号的试剂不要混用。保质前使用。
4. 使用一次性的吸头以免交叉污染, 吸取终止液和底物 A、B 液时, 避免使用带金属部分的加样器。
5. 使用干净的塑料容器配置洗涤液。使用前充分混匀试剂盒里的各种成份及样品。
6. 洗涤酶标板时应充分拍干, 不要将吸水纸直接放入酶标反应孔中吸水。
7. 底物 A 应挥发, 避免长时间打开盖子。底物 B 对光敏感, 避免长时间暴露于光下。避免用手接触, 有毒。实验完成后应立即读取 OD 值。
8. 加入试剂的顺序应一致, 以保证所有反应孔温育的时间一样。
9. 按照说明书中标明的时间、加液的量及顺序进行温育操作。

### ELISA 常见问题与解决方法

1. 阴性对照出现阳性结果
  - ① 样品、试剂被污染, 或加样时操作不当导致相邻孔之间溶液溅洒出现交叉污染——更换试剂, 小心操作。
  - ② 酶标板洗涤不彻底——洗板前先将抗体溶液倒干净, 然后清洗液倒满板孔, 确保能充分洗涤。
  - ③ 抗体量过多导致非特异性结合——根据说明书的推荐量使用抗体, 稀释抗体到适当浓度。
2. 酶标板整体背景高

- ① 抗体非特异性结合——应确保板孔进行了封闭并且使用的是恰当的封闭液以防止非特异性结合。
  - ② 底物结合浓度过高——对底物进行适当稀释。
  - ③ 反应时间过长——当酶标板显色足够进行吸光度读数时立即使用终止液终止反应，适当缩短显色时间。
  - ④ 底物溶液污染——正常底物溶液应是澄清透明的，若出现黄色或其他颜色表明受到污染，应更换新的底物溶液。
  - ⑤ 底物孵育过程没有避光——底物孵育应在避光条件下进行。
3. 复孔之间重复性差
- ① 样品数量不整齐，加样时间有长有短——加重复孔时尽量保持加样时间与第一次接近。
  - ② 加样量不一致——样品稀释前应充分混匀，并且使用同一移液枪。
  - ③ 洗涤条件、操作人员不一致——重复测定样品时，操作条件、人员应尽可能与上次保持一致。
4. 吸光值偏高或偏低
- ① 样品中待测抗原含量太低会导致测定结果偏低——可尝试增加样品使用量。
  - ② 加入抗体量不合适会造成结果偏低或偏高——使用建议抗体量或为了使结果更好尽可能调整抗体的最适用量。
  - ③ 孵育时间太短导致检测结果偏低——适当延长抗体或抗原的孵育时间，确保待测样品与检测抗体能充分结合。
  - ④ 孵育温度不适合——应保证抗体在最适宜条件下进行孵育（一般 37℃ 孵育 1h）。