

人TNFRSF1B双抗夹心ELISA检测试剂盒

请在实验前仔细阅读本说明书

产品货号: KE00350
规格: 96T
灵敏度: 2.6 pg/mL
检测范围: 15.6-1000 pg/mL
用途: 此试剂盒用于定量检测血清和血浆中的人TNFRSF1B浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

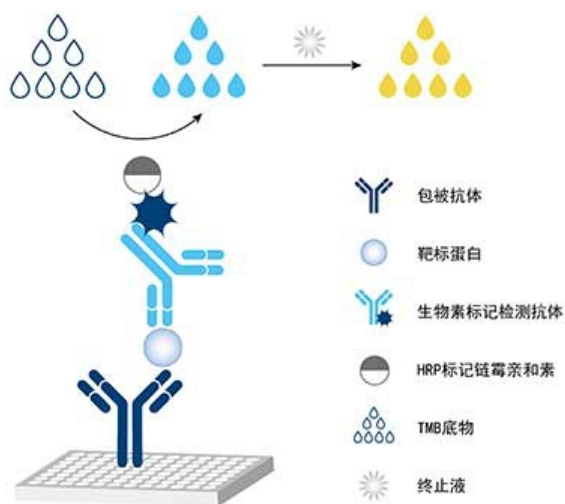
目录

| | |
|------------|---|
| 一：背景信息 | 3 |
| 二：检测原理 | 3 |
| 三：需自备的实验器材 | 3 |
| 四：试剂盒组分及储存 | 4 |
| 五：实验注意事项 | 4 |
| 六：样本准备 | 4 |
| 七：试剂准备 | 5 |
| 八：实验步骤 | 6 |
| 九：实验参数 | 7 |
| 9.1 参考标曲图 | 7 |
| 9.2 精密度 | 7 |
| 9.3 加标回收率 | 7 |
| 9.4 样本值 | 8 |
| 9.5 灵敏度 | 8 |
| 9.6 线性 | 8 |
| 9.7 特异性 | 8 |
| 十：参考文献 | 9 |

一：背景信息

肿瘤坏死因子- α (TNFA/TNF SF 2)是一种多功能细胞因子,在调节炎症、免疫功能、宿主防御和细胞凋亡中起关键作用(PMID: 16407280)。TNFA通过两种不同的细胞表面受体TNFR1 (TNFRSF1A, CD120a, p55)和TNFR2 (TNFRSF1B, CD120b, p75)发出信号。TNFR1被广泛表达,而TNFR2表现出更受限制的表达,发现于CD4和CD8 T淋巴细胞、内皮细胞、小胶质细胞、少突胶质细胞、神经元亚型、心肌细胞、胸腺细胞和人类间充质干细胞(PMID:20489699; 22374304)。与TNFR1相反, TNFR2没有死亡结构域。TNFR2只是抗凋亡反应的信号。然而,最近的证据表明, TNFR2也发出诱导TRAF2降解的信号(PMID: 22374304)。由于TNFR2基因多态性、TNFR2表达上调和TNFR2脱落, TNFR2途径中的各种缺陷与几种自身免疫性疾病的病理有关(PMID: 20489699)。

二：检测原理



◀双抗夹心模式图 (检测抗体标记生物素)

按操作顺序形成抗体夹心结构后,加入TMB底物,板孔液体由无色变成蓝色,再加入终止液液体变为黄色后进行吸光度值测定。

三：需自备的实验器材

- 3.1 酶标仪 (可读取450 nm和630 nm双波长);
- 3.2 高精度移液器及一次性移液器枪头;
- 3.3 洗板机 (亦可手动洗板);
- 3.4 EP管 (用于稀释标准品及样本);
- 3.5 吸水毛巾或滤纸 (用于拍干);
- 3.6 烧杯和量筒;
- 3.7 用于ELISA实验的数据分析的统计拟合软件 (推荐四参数拟合方法), 如: Origin, ELISA Calc等。

四：试剂盒组分及储存

| 英文名称 | 中文名称 | 规格 | 数量 |
|--|-------------------------|-----------|-----|
| Microplate | 预包被酶标板 - 96孔板 | 8孔 × 12条 | 1 块 |
| Protein standard | 标准品 - 冻干粉状 * | 2000 pg/瓶 | 2 瓶 |
| Detection Antibody (100×), biotinylated | 生物素标记检测抗体浓缩液 (100×) | 120 μL/支 | 1 支 |
| Streptavidin-HRP (100×) | HRP标记链霉亲和素浓缩液 (100×) ** | 120 μL/支 | 1 支 |
| Sample Diluent PT 6 | 样本稀释液 PT 6 | 30 mL/瓶 | 1 瓶 |
| Detection Diluent | 抗体稀释液 | 30 mL/瓶 | 1 瓶 |
| Wash Buffer Concentrate (20×) | 浓缩洗涤液 (20×) | 30 mL/瓶 | 1 瓶 |
| TMB | 显色底物 TMB | 12 mL/瓶 | 1 瓶 |
| Stop Solution | 终止液 | 12 mL/瓶 | 1 瓶 |
| Plate Cover Seals | 封板膜 | | 4 张 |
| 储存条件： 1：未开启试剂盒可在2-8℃条件下存放6个月或者在-20℃条件下存放1年 2：已开启试剂盒可在2-8℃存放7天 3：每次实验均使用新的标准品,使用后丢弃 | | | |

* 使用对应的样本稀释液对标准品进行复溶，复溶过程避免产生气泡

** 开盖前请离心

五：实验注意事项

- 5.1 避免皮肤接触终止液以及TMB 显色液；
- 5.2 在实验过程中，注意穿戴个人防护装备，如实验服，手套，口罩和护目镜；
- 5.3 请勿将不同批次的试剂进行混用，过期产品请勿使用；
- 5.4 在使用自动洗板机时，板孔加入洗涤液之后，设置30秒的浸泡程序，以提高分析的精确度。

六：样本准备

- 6.1 血清：全血标本室温凝固 30 min后1000×g 离心15 min，取上清立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融。
- 6.2 血浆：可用EDTA、肝素或柠檬酸盐作为抗凝剂，标本采集后1000×g 离心15 min，立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融
(注意：标本溶血会影响检测结果，因此溶血标本不宜进行检测)。

七：试剂准备

7.1 洗涤液 (1×)：

如果洗涤液 (20×) 有晶体析出, 37°C加热至晶体全部溶解。按1:20稀释倍数进行稀释: 如取30 mL 浓缩洗涤液 (20×), 加入570 mL 超纯水或去离子水, 得到洗涤液 (1×)。

7.2 检测抗体 (1×)：

开盖前瞬时离心, 按1:100比例进行稀释, 稀释前根据预先计算实验所需的总量配制 (100 μL/孔), 实际配制时应多配制0.1-0.2 mL。如10 μL 检测抗体浓缩液 (100×) 加 990 μL 抗体稀释液进行配制, 轻轻混匀。

7.3 HRP标记链霉亲和素 (1×)：

开盖前瞬时离心, 按1:100比例进行稀释, 稀释前根据预先计算实验所需的总量配制 (100 μL/孔), 实际配制时应多配制0.1-0.2 mL。如10 μL HRP标记的链霉亲和素浓缩液 (100×) 加 990 μL 抗体稀释液进行配制, 轻轻混匀。

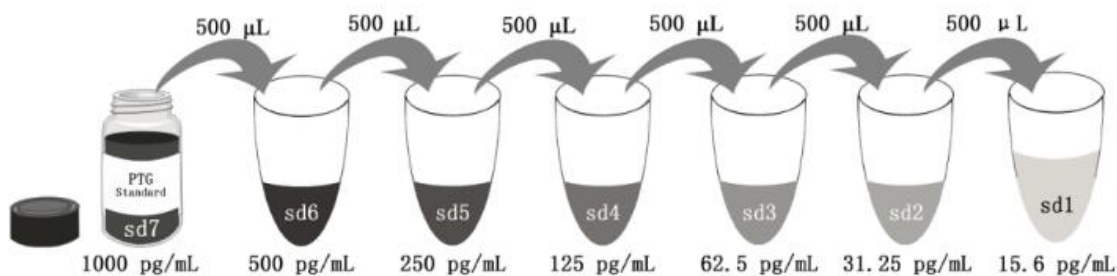
7.4 待检测样本：

不同的样本使用相应的样本稀释液进行稀释, 如果样本检测值超过标曲最高范围, 可将样本进行一定的稀释后再进行实验, 使样本的检测值处于标曲范围内, 不同样本的稀释倍数需自行优化。

稀释比推荐如下: 人血清和血浆样本1:4或1:8稀释; 样品采集、处理和储存的差异可能导致测值的改变。

7.5 梯度稀释的标准品：

用2 mL PT 6样本稀释液复溶标准品, 具体操作如下:



| | | | | | | | |
|---|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Add # μL of Standard diluted in the previous step | — | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL |
| # μL of Sample Diluent PT 6 | 2000 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL |
| | "sd7" | "sd6" | "sd5" | "sd4" | "sd3" | "sd2" | "sd1" |

八：实验步骤

实验前,需要将所需试剂在室温平衡20-30 min(检测抗体浓缩液、HRP标记链霉亲和素浓缩液不需要平衡室温,即用即取);在进行标准品、样本以及不同试剂加样时,更换枪头,避免接触微孔板的内表面,不同的试剂,使用不同的加样槽。

8.1 根据实验用量,取出需要用到的酶标板条,剩余板条加入干燥剂放入铝箔袋密封后存放于4°C,并于一周之内用完;

8.2 加样,分别设零孔、标准孔、待测样本孔。零孔加样本稀释液100 μL,余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本100 μL/孔,注意不要产生气泡(建议标准品和样本都做复孔,尽量避免实验误差,确保上样不间断,5-10 min完成加样);

8.3 酶标板盖上覆膜,37°C孵育2 h;

8.4 洗涤

1) 揭开封板膜(动作轻柔,避免动作过大导致液体溢出串孔),弃液体,拍干;

2) 洗涤液(1×)洗涤板条,每孔350-400 μL,洗涤后,甩掉液体拍干板条,重复此步骤4次,避免异物进入板孔以及板条干燥;

8.5 每孔加100 μL 检测抗体(1×)(参照试剂准备部分7.2),盖上封板膜,37°C孵育1 h;

8.6 重复步骤8.4;

8.7 每孔加100 μL HRP标记链霉亲和素(1×)(参照试剂准备部分7.3),盖上封板膜,37°C孵育40 min;

8.8 重复步骤8.4;

8.9 显色:每孔加TMB显色液100 μL,37°C避光显色15-20 min(如果颜色偏浅,可适当延长显色时间,不超过30 min;保持显色底物始终处于避光状态,显色底物在加样前应是无色透明,如有变色,请勿使用);

8.10 终止:每孔加终止液100 μL,蓝色变黄色。终止液与TMB显色液的加样顺序一致;(注意:眼睛和皮肤避免接触终止液)

8.11 读数:以630 nm为校正波长,用酶标仪在450 nm波长测量各孔的光密度(OD值)。加入终止液后5 min内进行读数,若无630 nm 波长,也可直接使用450 nm 波长读数;

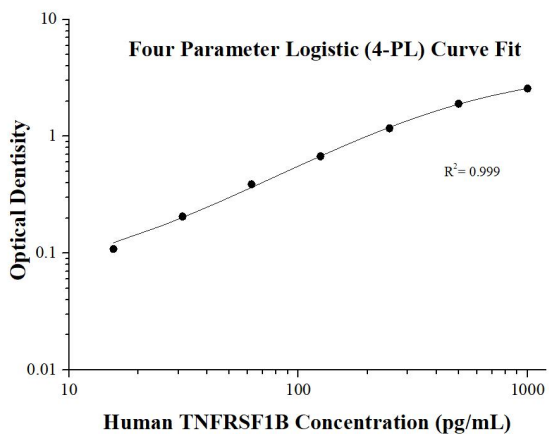
8.12 数据分析:每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值,设置复孔,取其平均值。以标准品的浓度为横坐标,OD值为纵坐标,使用专业软件(如Origin、ELISACalc等)进行四参数拟合(4-PL),根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度,乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

操作流程如下:

| 步骤 | 试剂 | 体积 | 孵育时间 | 洗涤次数 | 孵育温度 |
|----|--|--------|----------|-------|--------------|
| 1 | 标准品或样本 | 100 μL | 120 分钟 | 4 次 | 覆膜后37°C孵育 |
| 2 | 检测抗体(1×) | 100 μL | 60 分钟 | 4 次 | 覆膜后37°C孵育 |
| 3 | HRP标记链霉亲和素(1×) | 100 μL | 40 分钟 | 4 次 | 覆膜后37°C孵育 |
| 4 | 显色 TMB | 100 μL | 15-20 分钟 | 不需要洗涤 | 覆膜后37°C孵育,避光 |
| 5 | 终止液 | 100 μL | 0 分钟 | 不需要洗涤 | - |
| 6 | 加入终止液后以630 nm为校正波长,在450 nm处测量OD值,此过程建议不超过5分钟 | | | | |

九：实验参数

9.1 参考标曲图



| (pg/mL) | O.D | Average | Corrected |
|---------|------------------|---------|-----------|
| 0 | 0.1119 0.1188 | 0.11535 | - |
| 15.6 | 0.2246 0.2232 | 0.2239 | 0.10855 |
| 31.25 | 0.3285 0.3144 | 0.32145 | 0.2061 |
| 62.5 | 0.5155 0.4919 | 0.5037 | 0.38835 |
| 125 | 0.8097 0.7699 | 0.7898 | 0.67445 |
| 250 | 1.3204 1.2547 | 1.28755 | 1.1722 |
| 500 | 2.0369 2.0032 | 2.02005 | 1.9047 |
| 1000 | 2.6816 2.677 | 2.6793 | 2.56395 |

9.2 精密度

板内精密度：3个不同浓度的样本在板内重复测定 20次；

板间精密度：3个不同浓度的样本在板间重复测定 24次。

| 板内精密度 (CV内) | | | | |
|-------------|----|-------------|------|---------|
| 样本 | 数量 | 平均值 (pg/mL) | 标准差 | 变异系数CV% |
| 1 | 20 | 464.1 | 22.6 | 4.9 |
| 2 | 20 | 98.3 | 3.9 | 4.0 |
| 3 | 20 | 34.2 | 1.2 | 3.6 |

| 板间精密度 (CV间) | | | | |
|-------------|----|-------------|------|---------|
| 样本 | 数量 | 平均值 (pg/mL) | 标准差 | 变异系数CV% |
| 1 | 24 | 477.6 | 20.9 | 4.4 |
| 2 | 24 | 99.8 | 5.1 | 5.1 |
| 3 | 24 | 32.2 | 3.3 | 10.4 |

9.3 加标回收率

样本稀释后，在标曲范围内选择高、中、低3个浓度，进行人TNFRSF1B的加标回收率实验，结果如下：

| 样本类型 | 稀释倍数 | 平均值 (%) | 范围 (%) |
|------|------|---------|--------|
| 人血清 | 1:16 | 98 | 85-112 |
| | 1:32 | 95 | 85-108 |

9.4 样本值

人血清 - 应用本试剂盒，检测人血清样本中人TNFRSF1B的浓度。

| 样本类型 | 均值 (pg/mL) | 范围 (pg/mL) |
|------------|------------|--------------|
| 人血清 (n=16) | 1443.7 | 585.2-5433.0 |

9.6 线性

用对应样本稀释液稀释样本，使稀释后的检测值处于标曲范围内，线性数据如下：

(人血清样本预先稀释2倍。)

| 稀释倍数 | | 人血清 |
|------|--------|--------|
| 1:2 | 均值 (%) | 100 |
| | 范围 (%) | - |
| 1:4 | 均值 (%) | 91 |
| | 范围 (%) | 90-92 |
| 1:8 | 均值 (%) | 96 |
| | 范围 (%) | 84-107 |
| 1:16 | 均值 (%) | 102 |
| | 范围 (%) | 80-124 |

9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人TNFRSF1B，加入50 ng/mL以下细胞因子，无明显交叉反应

| | |
|---------------|---------------|
| Human: | Mouse: |
| G-CSF | GM-CSF |
| GM-CSF | IL-1 β |
| GRO α | IL-4 |
| IFN- γ | IL-5 |
| IL-1 α | IL-7 |
| IL-1 β | TNF- α |
| IL-2 | |
| IL-4 | |
| IL-5 | |
| IL-6 | |

十：参考文献

1. Beutler, B. and A. Cerami (1988) *Annu. Rev. Biochem.* 57:505.
2. Vilcek, J. and T.H. Lee (1991) *J. Biol. Chem.* 266:7313.
3. Dembic, Z. et al. (1990) *Cytokine* 2:231.
4. Schall, T.J. et al. (1990) *Cell* 61:361.
5. Loetscher, H. et al. (1990) *Cell* 61:351.
6. Seckinger, P. et al. (1989) *J. Biol. Chem.* 264:11966.
7. Olsson, I. et al. (1989) *Eur. J. Haematol.* 42:270.
8. Engelmann, H. et al. (1990) *J. Biol. Chem.* 265:1531.
9. Aderka, D. et al. (1992) *Lymphokine and Cytokine Res.* 3:157.
10. Chouaib, S. et al. (1991) *Immunology Today* 12:141.
11. Austgulen, R. et al. (1992) *J. Reproductive Immunol.* 22:105.
12. Van Zee, K. et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4845.
13. Spinaz, G. et al. (1992) *J. Clin. Invest.* 90:533.
14. Girardin, E. et al. (1992) *Immunology* 76:20.
15. Kalinkovich, A. et al. (1992) *Clin. Exp. Immunol.* 89:351.
16. Faustman D, M, et al.(2010) *Nat Rev Drug Discov.*