

原理：本试剂盒采用双抗体夹心酶联免疫吸附检测技术。特异性抗大鼠抗体预包被在高亲和力的酶标板上。酶标板孔中加入标准品和待测样本，经过孵育，样本中存在的抗原与固相抗体结合。洗涤去除未结合的物质后，加入生物素化的检测抗体孵育。洗涤去除未结合的生物素化的抗体，加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素 (Streptavidin HRP)。洗涤后，加入信号增强剂孵育，洗涤去除未结合的物质后，再次加入 Streptavidin HRP。洗涤后，加入显色底物 TMB，避光显色。颜色反应的深浅与样本中 TNF α 的浓度成正比。加入终止液终止反应，在 450nm 波长（参考波长 570 -630 nm）测定吸光度值。

组成：试剂盒保存于 2-8℃，有效期标注于标签上。只有恰当保存的试剂才是有保证的。如果试剂盒的组分需要再次使用，请确保上一次使用之后没有被污染。

组分	规格	规格	保存温度
预包被酶标板	48T	96T	4℃
标准品	1vial	2vials	-20℃
检测抗体	1vial	1vial	4℃
辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素	1vial	1vials	4℃
10×检测缓冲液	15ml	15ml	4℃
显色底物 TMB	6ml	11ml	4℃
终止液	11ml	11ml	4℃
20×洗液	50ml	50ml	4℃
封板膜	6 个	6 个	常温或 4℃

检测步骤

1. 样本采集与贮存

细胞培养上清

300 ×g 离心 10 分钟去除沉淀物，即刻检测，或者分装，-20℃以下贮存。

血清样本

离心管收集血清。血样凝集 30 分钟后，1,000 ×g 离心 10 分钟。吸取血清样本之后即刻检测，或者分装，-20℃以下贮存。

血浆样本

EDTA、枸橼酸钠或肝素抗凝收集血浆样本。1,000 ×g 离心 30 分钟收集样本。即刻检测，或者分装，-20℃以下贮存。

本试剂盒可能适用于其它生物学样本。细胞培养上清、血清和血浆已经过验证。

注意：检测前，样本中可见的沉淀必须去除。不要使用严重溶血或高血脂的样本。样本应分装并贮存于 -20℃，以避免 IGF-1 活性的丢失。如果在 24 小时内检测。样本可以存放在 2 -8℃。避免样本的反复冻融。在检测前，冷冻样本应缓慢地恢复至室温，轻柔地混匀。

2. 样本准备

正常小鼠血清血浆样本需要 1000 倍稀释。推荐两步稀释。第一步，10 μ l 样本+ 190 μ l 1×检测缓冲液。第二步，10 μ l 第一步稀释的混合样本+ 490 μ l 1×检测缓冲液。

正常大鼠血清血浆样本需要 4000 倍稀释。推荐两步稀释。第一步, 10 μ l 样本+ 490 μ l 1 \times 检测缓冲液。第二步, 10 μ l 第一步稀释的混合样本+ 790 μ l 1 \times 检测缓冲液。

3. 试剂准备

检测前请将所有的试剂、样本恢复至室温。

如果浓缩的试剂出现结晶, 37 $^{\circ}$ C 温浴, 直至结晶全部溶解。

1 \times 洗液

吸取 20 \times 浓缩洗液 50 ml 至 1 L 的量筒, 加蒸馏水至 1,000 ml, 轻轻混匀, 避免泡沫。转移至干净瓶内。2-25 $^{\circ}$ C 贮存, 1 \times 洗液可稳定保存 30 天。

1 \times 检测缓冲液

吸取 10 \times 浓缩检测缓冲液 15ml 至 250 ml 量筒, 加蒸馏水至 150 ml, 轻轻混匀, 避免泡沫。2-8 $^{\circ}$ C 贮存, 1 \times 检测缓冲液可稳定保存 30 天。

检测抗体

稀释前充分混匀。根据标准品和待检样本的数量, 用 1 \times 检测缓冲液按 1 : 100 稀释浓缩的检测抗体。

注意: 请在 30 分钟内使用稀释后的检测抗体。

辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素

稀释前充分混匀。根据标准品和待检样本的数量, 用 1 \times 检测缓冲液按 1 : 100 稀释浓缩的辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素。

注意: 请在 30 分钟内使用稀释后的辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素。

样本稀释

如果样本需要稀释, 请用试剂盒提供的 1 \times 检测缓冲液稀释血清/血浆样本, 用细胞培养基稀释细胞培养上清。

IGF-1 标准品

开盖前短暂离心, 用蒸馏水重溶 IGF-1 标准品, 重溶体积标注于 IGF-1 标准品的标签上。轻柔地涡旋震荡, 确保充分混匀, 重溶后标准品的浓度为 2,000 pg/ml。重溶后静置 10-30 分钟。稀释前充分混匀。

请使用聚丙烯管进行标准品稀释。

血清/血浆样本标准曲线的制备:

取 230 μ l 浓缩的 IGF-1 标准品, 加入 230 μ l 1 \times 检测缓冲液, 作为标准曲线的最高浓度(1,000 pg/ml)。在每一个试管中加入 230 μ l 1 \times 检测缓冲液。使用高浓度标准品做 1 : 1 系列稀释。每次移液时, 请确保充分混匀。以 1 \times 检测缓冲液作为标准曲线的零浓度。

细胞培养上清样本标准曲线的制备:

取 230 μ l 浓缩的 IGF-1 标准品, 加入 230 μ l 细胞培养基, 作为标准曲线的最高浓度(1,000 pg/ml)。在每一个试管中加入 230 μ l 细胞培养基。使用高浓度标准品做 1 : 1 系列稀释。每次移液时, 确保充分混匀。以细胞培养基作为标准曲线的零浓度。

4. 检测步骤

检测之前请将所有的试剂、样本平衡至室温。

- 1) 准备好所有需要的试剂及工作浓度标准品。
- 2) 将不需要的板条拆卸下来, 放回装有干燥剂的铝箔袋, 重新封好封口。
- 3) 浸泡酶标板: 加入 300 μ l 1 \times 洗液静置浸泡 30 秒。为了获得理想的实验结果浸泡是必须的。弃掉洗液之后, 在吸水纸上将微孔板拍干。洗板完成之后, 请立即使用微孔板, 不要让微孔板干燥。
- 4) 加标准品: 标准品孔加入 100 μ l 2 倍比稀释的标准品。空白孔加入 100 μ l 1 \times 检测缓冲液(血清/血浆样本)或培养基(细胞培养上清样本)。
- 5) 加加样本: 血清/血浆: 样本孔加入 100 μ l 预稀释样本。细胞培养上清: 样本孔加入 100 μ l 细胞培养上清。

(样本稀释请参考第 6 页“样本准备”)。保证步骤 4、5 连续加样, 不要间断。加样过程在 15 分钟内完成。

6) 孵育: 使用封板膜封板。300 转/分钟振荡, 室温孵育 2 小时。

7) 洗涤: 弃掉液体, 每孔加入 300 μ l 洗液洗板, 洗涤 6 次。每次洗板, 在吸水纸上拍干。为获得理想的实验性能, 必须彻底移除残留液体。

8) 加检测抗体: 每孔加入 100 μ l 稀释的检测抗体(1:100 稀释)。使用封板膜封板。300 转/分钟振荡, 室温孵育 1 小时。

9) 洗涤: 重复步骤 7。

10) 加酶孵育: 每孔加入 100 μ l 稀释的辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(1:100 稀释)。使用新的封板膜封板。300 转/分钟振荡, 室温孵育 45 分钟。

11) 洗涤: 重复步骤 7。

12) 加底物显色: 每孔加入 100 μ l 显色底物 TMB, 避光, 室温孵育 5 -30 分钟。

13) 加终止液: 每孔加入 100 μ l 终止液。颜色由蓝色变为黄色。如果颜色呈现绿色或者颜色的变化明显不均匀, 请轻轻叩击板框, 充分混匀。

14) 检测读数: 在 30 分钟之内, 使用酶标仪进行双波长检测, 测定 450 nm 最大吸收波长和 570 nm 或 630 nm 参考波长下的 OD 值。校准后的 OD 值为 450 nm 的测定值减去 570 nm 或 630 nm 的测定值。仅使用 450 nm 测定会导致 OD 值偏高, 并且准确度降低。

注意事项

1) 所有的化学试剂理应被认为具有潜在危害。

2) 推荐只有经过良好实验室培训的工作人员方可操作本试剂盒。操作时请佩戴合适的防护设施, 例如白大衣、乳胶手套、安全眼镜等。

3) 请避免试剂接触皮肤和眼睛。如不慎接触, 请立即用大量清水清洗。

4) 试剂盒中的终止液为酸性溶液, 在使用终止液时, 请佩戴防护服, 及防护眼睛、手及面部的设施。

5) 本试剂盒用于科学研究, 不能用于诊断治疗。

6) 请不要使用其他批号或其他来源的试剂替代本试剂盒中的试剂。

7) 请不要使用过期的试剂。

8) 在试剂盒的贮存或孵育过程请避免强光照射。

9) 在操作试剂盒或处理样本的区域请不要饮食。

10) 不要让试剂或样本接触皮肤和粘膜。

11) 在操作试剂盒或处理样本时请佩戴乳胶或一次性手套。

12) 显色底物避免与氧化试剂和金属接触。

13) 避免气溶胶的产生。

14) 为了避免微生物的污染, 以及试剂与样本间的交叉污染, 请使用一次性枪头。

15) 使用干净的容器配制试剂。

16) 暴露于酸性环境会抑制结合。

17) 试剂的准备必须使用蒸馏水或去离子水。

18) 显色底物在使用之前必须平衡至室温。

19) 样本可能含有传染性病原体, 处理样本和可能的污染材料的首选方法是 121.5 $^{\circ}$ C, 最少 1 小时。

20) 液体废弃物的处理。不含酸的液体废弃物, 加入 1.0 % 的次氯酸钠, 浸泡 30 分钟。含酸的液体废弃物, 请先中和, 再加入次氯酸钠。