

# 人肿瘤坏死因子受体超家族成员 9 酶联免疫吸附测定试剂盒

产品编号：MA0823 规格：96 次

## 产品内容

| 产品组成                | 体积/数量            |
|---------------------|------------------|
| 人 TNFRSF9 预包被板      | 8 孔条×12 个        |
| 样品稀释液               | 30mL             |
| 重组人 TNFRSF9 标准品(冻干) | 2 支(10ng/支)      |
| 生物素标记人 TNFRSF9 抗体   | 130 μL(效价 1:100) |
| 抗体稀释液               | 12mL             |
| 酶复合物(HRP 标记的链霉亲和素)  | 130 μL(效价 1:100) |
| 酶复合物稀释液             | 12mL             |
| 浓缩洗涤液(25×)          | 30mL             |
| 显色剂 TMB             | 10mL             |
| 终止液                 | 10mL             |
| 封板胶纸                | 4 张              |

## 产品简介

本试剂盒采用双抗体夹心ELISA法，用于检测样品中人TNFRSF9的浓度。人TNFRSF9捕获抗体已经预包被于酶标板上，当加入样品或标准品时，其中的人TNFRSF9会与捕获抗体结合，而其它游离成分则会通过洗涤被除去。接着，再加入生物素标记的人TNFRSF9抗体后，抗人TNFRSF9抗体与人TNFRSF9接合，形成夹心的免疫复合物，其它游离成分则通过洗涤被除去。随后加入酶复合物，生物素与酶复合物特异性结合，这样酶复合物上的HRP就与夹心的免疫复合物连接起来，而其它游离成分则通过洗涤被除去。最后加入显色剂，若样品中存在人TNFRSF9，则会形成免疫复合物，其上连接的HRP会催化无色的显色剂氧化生成蓝色物质，而后加入终止液，最终产物呈黄色。通过酶标仪检测，读取450nm处的OD值，人TNFRSF9浓度与OD450值之间呈正比，通过检测标准品绘制标准曲线，对照未知样品中OD值，即可计算出样品中人TNFRSF9的浓度。

TNFRSF9是肿瘤坏死因子受体超家族成员9（Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member9）的简称，也被称为4-1BB或CD137。它主要表达于活化的T细胞表面，也可表达于粒细胞或树突状细胞表面。TNFRSF9与其配体CD137L（也称为4-1BBL）结合后，可以启动双向信号转导：正向信号能够刺激T细胞活化和增殖，而反向信号则可以刺激B细胞增殖。

在医学领域，TNFRSF9在肿瘤治疗中具有重要地位。针对TNFRSF9的疗法，如4-1BB激动剂，能够刺激免疫系统对肿瘤进行更有效的攻击。



## 产品参数:

|      |                       |
|------|-----------------------|
| 检测范围 | 31.25pg/mL~2,000pg/mL |
| 敏感性  | 10pg/mL               |
| 特异性  | 系统和其它因子无交叉反应          |
| 样本类型 | 人血清、血浆、体液、组织匀浆或细胞培养上清 |

## 使用方法

### (一) 样品制备

1.根据样品种类选择相应的处理方法:

(1) 细胞上清: 将细胞培养上清液100~500×g离心5min, 去除悬浮物后即可。

(2) 血清样品: 将全血在室温下静置0.5~2h, 待其自然凝固并析出血清后, 离心取黄色上清即可(4℃, 1,000~2,000×g, 10min), 注意请勿吸取沉淀, 制备好的血清需置于冰上待用, 请勿在其中添加任何防腐剂或抗凝剂;

(3) 血浆样品: 使用EDTA对全血进行抗凝处理后, 混合均匀置于冰上, 离心取黄色上清即可(4℃, 1,000~2,000×g, 10min), 注意请勿吸取沉淀, 制备好的血浆需置于冰上待用;

(4) 组织匀浆/体液: 离心去除沉淀即可。

**注意:**

- ①若待测样品无法及时检测, 样品制备完成后, 请分装冻存于-20℃, 避免反复冻融;
- ②请保证待测样品清澈透明, 检测前如发现样品中有悬浮物, 需通过离心去除;
- ③为了保证检测结果准确, 请勿使用溶血、黄疸、高血脂或污染的样品。

### 2. 稀释样本

查阅相关文献, 预估样品中待测因子的含量, 从而确定适当的稀释倍数, 使稀释后样品中待测因子的浓度处于ELISA试剂盒的最佳检测范围。根据待测因子含量的不同, 分别采取不同的稀释方案:

(1) 待测因子含量在20~200ng/mL范围内, 一般按1:100稀释, 即向297 μL样品稀释液中加入3 μL样品;

(2) 待测因子含量在2~20ng/mL范围内, 一般按1:10稀释, 即向225 μL样品稀释液中加入25 μL样品;

(3) 待测因子含量在31.25~2,000pg/mL范围内, 一般按1:2稀释, 即向100 μL样品稀释液中加入100 μL样品;

(4) 待测因子含量≤31.25pg/mL, 样品一般无需稀释。

以上方案仅供参考, 实验中请详细记录样品的稀释方法。

### (二) 检测准备工作

3.试剂盒自4℃冰箱取出后, 请置于室温平衡20min; 如从-20℃取出, 各组分需彻底融化后再平衡20min; 检测完成后, 剩余试剂请及时置于4℃或-20℃保存。

4.将浓缩洗涤液(25×)用双蒸水或去离子水稀释成1×洗涤液。



5.重组人TNFRSF9标准品的稀释和使用(在使用前2h内准备, 室温操作, 请严格控制在25~28°C)

(1) 配制10ng/mL标准品: 取1mL样品稀释液加入标准品管内, 盖好后静置15min以上, 然后反复颠倒/搓动以助溶解;

(2) 配制2,000pg/mL标准品: 取200 $\mu$ L 10ng/mL的标准品加入有800 $\mu$ L样品稀释液的EP管中, 混匀, 做上标记;

(3) 按下表将2,000pg/mL标准品用样品稀释液进行倍比梯度稀释。(最高浓度为2,000pg/mL, 将标准品稀释液作为浓度0pg/mL。)

| 管号 | 稀释液用量( $\mu$ L) | 复溶后标准品用量( $\mu$ L) | 标准品的最终浓度(pg/mL) |
|----|-----------------|--------------------|-----------------|
| A  | 0               | 1000               | 2,000           |
| B  | 300             | 300(从A管取出)         | 1,000           |
| C  | 300             | 300(从B管取出)         | 500             |
| D  | 300             | 300(从C管取出)         | 250             |
| E  | 300             | 300(从D管取出)         | 125             |
| F  | 300             | 300(从E管取出)         | 62.5            |
| G  | 300             | 300(从F管取出)         | 31.25           |
| H  | 300             | 0                  | 0               |

**注意:** 标准品复溶加样后, 剩余部分请丢弃。

6.准备生物素标记人TNFRSF9抗体工作液

(1) 按每孔需添加100 $\mu$ L抗体工作液, 计算其总用量(为弥补操作中的损耗, 需多配制100~200 $\mu$ L);

(2) 按1 $\mu$ L生物素标记人TNFRSF9抗体添加99 $\mu$ L抗体稀释液的比例配制工作液, 轻轻混匀。

7.准备酶复合物工作液(需在使用前1h内准备)

(1) 按每孔需添加100 $\mu$ L酶复合物工作液, 计算其总用量(为弥补操作中的损耗, 需多配制100~200 $\mu$ L);

(2) 按1 $\mu$ L酶复合物添加99 $\mu$ L酶复合物稀释液的比例配制工作液, 轻轻混匀。

### (三) 检测流程

8.通过计算确定一次实验所需的板条数, 取出所需板条放置于框架内, 多余的板条请放回铝箔袋密封, 保存于4°C或-20°C。

**注意:**

①标准品和样品建议做双复孔检测;

②每次实验均需绘制标准曲线。

9.将用样品稀释液稀释后的样品和不同浓度标准品(100 $\mu$ L/孔)分别加入相应孔中, 用封板胶纸封住反应孔, 37°C孵育90min。

**注意:**

①请查阅相关文献确定样品中待检测蛋白的大致浓度, 若其大于本试剂盒标准曲线的最大标准品浓度, 请将样品适当稀释后再进行检测;

②整个加样过程不宜超过10min, 否则可能会影响检测结果。

10.甩去酶标板内液体, 无需洗板, 将板倒扣在吸水纸上拍干。



11.加入稀释后的生物素标记人TNFRSF9抗体工作液(100 $\mu$ L/孔), 用封板胶纸封住反应孔, 37 $^{\circ}$ C孵育60min。

12.洗板5次, 每孔1 $\times$ 洗涤液用量为300 $\mu$ L, 注入与吸出间隔15~30s, 洗完后将板倒扣在吸水纸上拍干。

**注意: 洗涤过程至关重要, 洗涤不充分会导致结果产生较大误差。**

13.加入稀释后的酶复合物(100 $\mu$ L/孔), 用封板胶纸封住反应孔, 37 $^{\circ}$ C避光孵育30min。

14.洗板5次, 方法同步骤12;

15.加入显色剂TMB(100 $\mu$ L/孔), 用封板胶纸封住反应孔, 避光37 $^{\circ}$ C反应10~25min。注意:

①在保存和使用时, 请勿将TMB接触氧化剂和金属;

②因实验室条件差异, 最佳显色时间会有所不同, 反应充分时肉眼可见标准品的前3~4孔有明显的梯度蓝色。

16.加入终止液(100 $\mu$ L/孔), 混匀后即刻使用酶标仪测量OD450, 同时设定540nm或570nm作为校正波长, 即可计算得到校正吸光度值(OD450-OD540或OD450-OD570);

**注意: 读取OD值建议在10min内完成。**

#### (四) 数据分析

17.绘制标准曲线。以标准品浓度作横坐标, OD值作纵坐标, 利用计算机软件作四参数逻辑(4-PL)曲线拟合创建标准曲线, 通过样品的OD值即可在标准曲线上计算出其相应浓度。

**注意:**

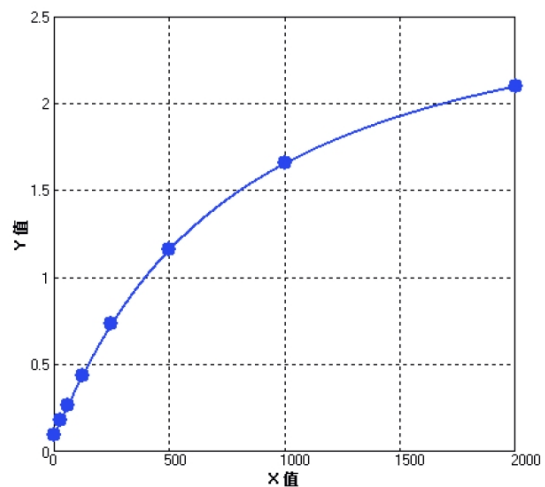
①复孔OD值在20%的差异范围内结果才有效, 复孔OD值取平均后可作为测量值;

②若样品OD值高于标准曲线上限, 应适当稀释后重测, 计算浓度时应乘以稀释倍数。

#### 标准曲线范例

人TNFRSF9参考标准曲线

| 标准品浓度       | O.D.  |
|-------------|-------|
| 0 pg/mL     | 0.094 |
| 31.25 pg/mL | 0.180 |
| 62.5 pg/mL  | 0.269 |
| 125 pg/mL   | 0.440 |
| 250 pg/mL   | 0.733 |
| 500 pg/mL   | 1.161 |
| 1,000 pg/mL | 1.657 |
| 2,000 pg/mL | 2.097 |



**注意: 本图仅供参考, 应以同次试验标准品所绘标准曲线计算样品含量。**

#### 保存条件



2~8℃保存，自生产之日起6个月有效；长期储存请置于-20℃，自生产之日起12个月有效。

## 注意事项

1. 浓缩洗涤液低温情况下可能会出现结晶，请水浴加热使结晶完全溶解后再配制工作液；
2. 严禁混用不同批号试剂盒的组分；
3. 加样过程请避免产生气泡，实验操作过程中一定要保证试剂充分混匀，否则会使结果产生较大误差；
4. 说明书中提到的室温条件，请严格控制在25~28℃；
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；
6. 本产品仅限科研使用。

J240101

