

## 小鼠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: MA0840 规格: 96 次

### 产品内容

产品组成	体积/数量
小鼠 TNFRSF9 预包被板	8 孔条×12 个
样品稀释液	30mL
重组小鼠 TNFRSF9 标准品(冻干)	2 支(10ng/支)
生物素标记小鼠 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,用于检测样品中小鼠 TNFRSF9 的浓度。小鼠 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,其中的小鼠 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小鼠 TNFRSF9 抗体后,抗小鼠 TNFRSF9 抗体与小鼠 TNFRSF9 结合,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,若样品中存在小鼠 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 450 nm 处的 OD 值,小鼠 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,即可计算出样品中小鼠 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 Member 9) 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	31.25 pg/mL~2,000 pg/mL
敏感性	6 pg/mL
特异性	系统和其它因子无交叉反应
样本类型	小鼠血清、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 20~200 ng/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 2~20 ng/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 31.25~2,000 pg/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≤31.25 pg/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.重组小鼠 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℃)

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

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



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

管号	稀释液用量(μL)	复溶后标准品用量(μL)	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. 准备生物素标记小鼠 TNFRSF9 抗体工作液

(1) 按每孔需添加 100 μL 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 μL)；

(2) 按 1 μL 生物素标记小鼠 TNFRSF9 抗体添加 99 μL 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 μL 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 μL)；

(2) 按 1 μL 酶复合物添加 99 μL 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℃ 或 -20℃。

**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 μL/孔)分别加入相应孔中，用封板胶纸封住反应孔，37℃ 孵育 90 min。

**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 10 min，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小鼠 TNFRSF9 抗体工作液(100 μL/孔)，用封板胶纸封住反应孔，37℃ 孵育 60 min。

12. 洗板 5 次，每孔 1× 洗涤液用量为 300 μL，注入与吸出间隔 15~30 s，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 μL/孔)，用封板胶纸封住反应孔，37℃ 避光孵育 30 min。



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。

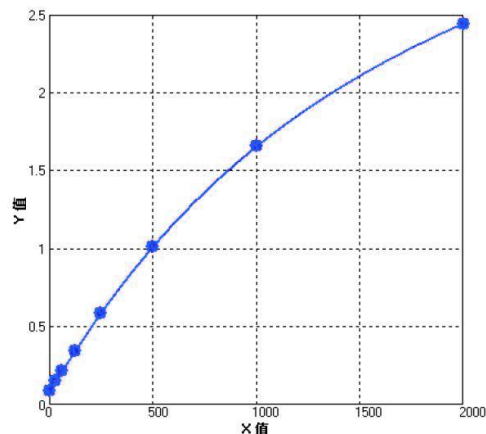
**注意：**

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

标准品浓度	O.D.
0 pg/mL	0.090
31.25 pg/mL	0.152
62.5 pg/mL	0.216
125 pg/mL	0.344
250 pg/mL	0.588
500 pg/mL	1.013
1,000 pg/mL	1.656
2,000 pg/mL	2.443



**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 $^{\circ}$ C保存，自生产之日起6个月有效；长期储存请置于-20 $^{\circ}$ C，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 $^{\circ}$ C；
- 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。

J240601

