

Human Nuclear Factor Kappa B (NFkB) ELISA Kit

Catalog NO. : RK01935

version: 2.0

*使用产品前，请务必阅读产品包装内说明书

产品简介

本试剂盒产品使用夹心法定量测定人细胞裂解液、组织匀浆或其它生物体液中 NFkB 的含量。

产品检测原理

本实验采用双抗夹心 ELISA 法。将抗 NFkB 抗体预先包被在酶标板上，向微孔中分别加入标准品和样品，样本中 NFkB 与固相载体上的抗体结合。孵育后，未结合的样品在洗涤过程中会被洗去，加入抗 NFkB 的检测抗体，形成双抗体夹心。洗去未结合的检测抗体，然后向微孔中加入酶结合物。孵育和洗涤后，加入底物 TMB。样品中 NFkB 的含量与 TMB 反应的颜色深浅呈正相关，加入酸终止反应并测量吸光值。根据梯度稀释的 NFkB 标准品的吸光值绘制标准曲线并求出样品的浓度。

试剂盒组分及保存条件

未拆封的试剂盒可在 2-8° C 保存 1 年，已拆封的产品须在 1 个月内使用完。

组分	规格	货号	拆封后保存条件
抗体预包被酶标板 Antibody Coated Plate	8×12	RM40544	将未使用的板条放回装有干燥剂的铝箔袋中，并重新密封，可在 2-8° C 存储 1 个月。
冻干标准品 Standard Lyophilized	2 支	RM40545	复溶后不建议再次使用。
浓缩生物素化抗体 (100×) Concentrated Biotin Conjugate Antibody (100×)	1 × 120ul	RM40546	可在 2-8° C 存储 1 个月。
浓缩链霉亲和素-HRP (100x) Streptavidin-HRP Concentrated (100×)	1 × 120ul	RM40547	可在 2-8° C 存储 1 个月。

标准品/样本稀释液 (R1) Standard/Sample Diluent (R1)	1 × 20 mL	RM00023	可在 2-8° C 存储 1 个月。
生物素化抗体稀释液 (R2) Biotin-Conjugate Antibody Diluent (R2)	1 × 12 mL	RM00024	
链霉亲和素-HRP 稀释液 (R3) Streptavidin-HRP Diluent (R3)	1 × 12 mL	RM00025	
浓缩洗涤液 (20x) Wash Buffer (20x)	1 × 30 mL	RM00026	
显色底物 TMB Substrate	1 × 12 mL	RM00027	
终止液 Stop Solution	1 × 6 mL	RM00028	
封板膜 Plate Sealers	4 张		
说明书 Specification	1		

实验所需的材料

1. 酶标仪，并配置主波长 450nm，次波长 630nm 或 570nm。
2. 单/多通道移液器及吸头。
3. 去离子水或蒸馏水。
4. 洗瓶或是自动洗板机。
5. 恒温箱。
6. 灭菌的试管或是 EP 管，用于样本或是标准蛋白的稀释。

重要提示

***本产品仅用于科研，不能用于临床诊断。**

1. 请留意产品标签上的有效期时间，并在有效期前使用本产品。
2. 请勿将不同批次或者来自不同厂家的试剂混合使用。
3. 如测试获得的样本 OD 值超过了产品的最高检测限，请使用产品中的标准品/样本稀释液（R1）对样本进行稀释。所以，在正式测试样本前，建议先进行样本的预测试。
4. 实验过程中的加样、洗板、孵育时间、孵育温度等操作均会对最终结果造成影响，请严格管理实验流程并做好记录。
5. 样本的收集、处理及保存均会对检测结果产生影响，请务必严格管理样本的处理过程。
6. 在本试验中对所有因素进行试验之前，不能排除干扰的可能性。

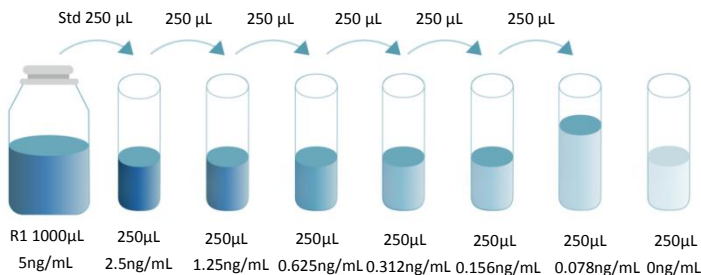
7. 相关试剂中可能存在有害物质，使用中请注意佩戴手套，必要时佩戴护目镜。
8. 终止液为腐蚀性液体，请做好相关防护。
9. 为保证最佳检测效果，相关试剂组分的保存请参照标签或是说明书。
10. 试剂配制后的混匀对检测结果非常重要，但部分蛋白或是抗体可能对剧烈的涡旋非常敏感，可能造成活性损失，请谨慎使用涡旋。
11. 请使用灭菌的耗材进行试剂配制，以免造成试剂污染，影响最终检测结果。
12. 为保证最佳检测效果，溶解后的标准蛋白及相关试剂的工作液不建议冻存后重复使用。
13. 产品在储存或是使用中，请注意避光。
14. 为保证最佳检测效果，在加不同样本时，请注意更换吸头。
15. 请严格按照说明书的要求进行试剂配制。如果您将分次使用试剂盒，请使用封口袋密封好预包被板，并且在开封后的 1 个月内使用完。
16. 48T 的试剂盒也同样可参考说明书进行实验。

样本收集与保存

1. 细胞裂解液：分析之前需要先按照以下说明裂解细胞，用冷 PBS 轻轻洗涤粘附的细胞，用胰蛋白酶分离，然后以 $1,000 \times g$ 离心 5 分钟进行收集（可通过直接离心收集悬浮细胞）。将细胞在冷 PBS 中洗涤 3 次，将细胞重悬在新鲜裂解缓冲液中，浓度为 10^7 细胞/mL。如果有必要，可以对细胞进行超声处理直到溶液澄清为止。在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 下以 $1,500 \times g$ 的速度离心 10 分钟以去除细胞碎片。立即测定或分装并保存在 -20°C 以下。
2. 组织匀浆：根据组织类型的不同，组织匀浆的制备方法不同。在冰冷的 PBS 中冲洗组织以彻底去除多余的血液，然后研磨前称重。将组织切成小块，并使用新鲜的裂解缓冲液（根据靶蛋白的亚细胞位置选择不同的裂解缓冲液）（例如，在 200mg 组织样品中添加 1mL 裂解缓冲液）在冰上用玻璃匀浆器（也用 Micro Tissue Grinders 炒锅）进行研磨；将所得悬浮液用超声细胞破碎仪超声处理，直至溶液澄清。将匀浆以 $10,000 \times g$ 离心 5 分钟。收集上清液并立即测定或等分并保存在 -20°C 以下。
3. 其它生物体液： $1000 \times g$ 离心 20 分钟，取上清即可检测，或将上清置于 -20°C 或 -80°C 保存，避免反复冻融。
4. 避免使用溶血、高血脂血清/血浆样本。

试剂准备

1. 使用前将所需使用的试剂平衡至室温。如果浓缩液中有结晶析出，需要将试剂置于室温轻轻摇动，直至晶体完全溶解。
2. 标准品：向冻干品中加入 1.0ml 的标准品/样本稀释液 R1，轻轻混匀至少 15min，使冻干品完全溶解至浓度为 5ng/mL。按照下图准备好包含 R1 稀释液的 EP 管，并按照提示进行梯度稀释（建议标准曲线使用以下浓度：5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 0.156, 0.078, 0ng/mL）。



3. 浓缩生物素化抗体 (100x)：在使用前用生物素化抗体稀释液 (R2) 将浓缩生物素化抗体以 1: 100 的比例稀释，注意：稀释后的工作液应在 30 分钟内使用。
4. 浓缩链霉亲和素-HRP (100x)：在使用前用链霉亲和素-HRP 稀释液 (R3) 将浓缩链霉亲和素-HRP 以 1: 100 的比例稀释。注意：稀释后的工作液应在 30 分钟内使用。

5. 洗涤液：在使用前用双蒸水或去离子水将洗涤液以 1：20 的比例稀释。

样本准备

不同的样本需要根据具体情况选择合适的稀释倍数，稀释样本请使用试剂盒内的标准品/样本稀释液（R1）。

1. 细胞上清：由于细胞上清样本因实验条件不同，呈现较大的差异，故细胞上清样本建议进行预测试来决定合适的稀释倍数，样本稀释请使用标准品/样本稀释液（R1）或是 PBS。
2. 血清/血浆：样本经测试，建议原液使用。

实验步骤

为获得理想的实验结果，请注意，所需使用的试剂在使用前平衡到室温。

1. 从板框上取下待用的微孔板条，将剩余的板条放回装有干燥剂的铝箔袋中，然后重新密封保存。
2. 每孔加入 1x 洗涤缓冲液 350 μ L，静置 40 秒后弃去液体，该步骤共洗涤 3 次。
3. 在空白孔中添加 100 μ L 标准品/样本稀释液（R1）。
4. 在其他孔中分别加入 100 μ L 不同浓度的标准品或样品，用提供的封板膜封闭板孔，37℃ 孵育 2 小时。
5. 在使用前 15 分钟配制好生物素化抗体（100x）工作液。
6. 弃去孔中液体，重复步骤 2 中的洗涤步骤。
7. 每孔中加入生物素化抗体工作液（100 μ L/孔），并盖上新的封板膜，37℃ 下孵育 1 小时。
8. 使用前 15 分钟配制好链霉亲和素-HRP（100x）的工作液。
9. 弃去孔中液体，重复步骤 2 中的洗涤步骤。
10. 每孔中加入链霉亲和素-HRP 工作液（100 μ L/孔），并盖上新的封板膜，37℃ 孵育 30 分钟。
11. 预热酶标仪。
12. 弃去孔中液体，重复步骤 2 中的洗涤步骤。
13. 向孔中加入 TMB 底物（100 μ L/孔）。在 37℃ 下避光孵育 15-20 分钟。

14. 加入终止液（50 μ L/孔），并立即放入酶标仪，在 5min 内测定每个孔 450nm 的 OD 值。如果可以选择校正波长，则设置为 570 nm 或 630 nm。 并从 450 nm 的读数中减去 570 nm 或 630 nm 的读数，这种方式可以校正并去除非显色物质的 OD 值，从而获得更准确的检测结果。如果无法选择校正波长，则获得的读数将偏高，导致读数的准确度下降。

简要实验流程

准备好需要的标准品和试剂

洗板 3 次



向孔中加入 100ul 标准品或待测样本

37℃ 孵育 2 小时，然后洗板 3 次



每孔加 100ul 生物素化抗体工作液

37℃ 孵育 1 小时，然后洗板 3 次



每孔加 100ul 链霉亲和素-HRP 工作液

37℃ 孵育 0.5 小时，然后洗板 3 次



加入 100ul 底物溶液，37℃ 避光，孵育 15-20 分钟



加入 50ul 终止液



5min 内检测 450nm 波长的 OD 值

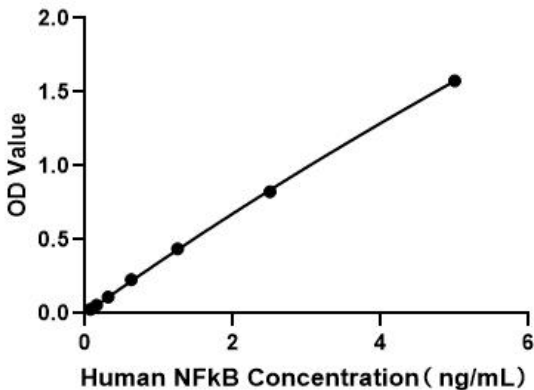
校正波长设置为 570nm 或 630nm

结果计算

1. 计算标准蛋白各浓度、质控、样本等复孔的平均 OD 值，每个测试的 OD 值都应减去空白孔的 OD 值以及次波长的 OD 值。
2. 使用测试获得的 OD 值绘制标准曲线，推荐使用 4-PL 拟合，具体也可根据需求选择其他拟合方式来绘制标准曲线。使用计算机软件以吸光度 OD 值为纵坐标 (Y)，相应的 NFkB 标准品浓度为横坐标 (X)，绘制标准曲线。样品的含量可根据其 OD 值由标准曲线计算出相应的浓度。
3. 如果样本在上样检测时进行了稀释，那么计算获得浓度需要乘以相应的稀释倍数。

典型数据

此标准曲线图仅供参考，计算实验结果请以实际实验数据进行。



检测范围

0.078–5ng/mL

灵敏度

最低检测 NFkB 可达 0.039ng/mL。

特异性

该方法对 NFkB 的检测灵敏度高，特异性好，NFkB 与类似物之间没有明显的交叉反应或干扰。

注意：

由于现有的技术和知识的限制，我们不可能完成 NFkB 与所有类似物之间的交叉反应检测，因此交叉反应可能仍然存在。

精密度

批内差

在同一块板上重复测试三个已知浓度的样品 20 次，计算浓度的变异系数（CV）。

批内 $CV < 10\%$ 。

批间差

用两批试剂盒对三个已知浓度的样品分别进行 20 次测试，计算浓度的变异系数（CV）。

批间 $CV < 15\%$ 。

	批内精密度			批间精密度		
样本	1	2	3	1	2	3
数量	20	20	20	20	20	20
浓度 (ng/mL)	1.2	2.6	4.3	1.1	2.5	4.8
标准偏差 (SD)	0.05	0.12	0.18	0.06	0.17	0.39
变异系数 CV (%)	4.5	4.6	4.1	5.6	6.8	8.1

回收率

将高、中、低 3 个不同浓度的 NFκB 蛋白加入到对应的样本中检测，并计算蛋白的回收率（实际测试的样本浓度/理论样本浓度 x100%）。

样本类型	平均回收率 (%)	范围 (%)
细胞上清 (n=5)	93	88-108
血清 (n=5)	98	91-106

线性

将高浓度 NF κ B 加入样本中，在标准曲线范围内稀释并计算线性。

/	/	细胞上清 (n=5)	血清 (n=5)
1:2	平均符合率 (%)	95	89
	范围 (%)	90-101	82-95
1:4	平均符合率 (%)	104	92
	范围 (%)	93-105	89-95
1:8	平均符合率 (%)	106	89
	范围 (%)	96-116	81-97
1:16	平均符合率 (%)	104	90
	范围 (%)	90-108	84-98

ELISA 常见问题分析及解决方法

问题描述	可能原因	解决方法
高背景值	洗板不充分	按要求充分洗涤，保证洗板时间、次数及每孔加样量无误
	孵育条件不正确	检查孵育时间、温度是否按要求进行
	试剂、样本的交叉污染	注意实验过程中可能造成样本交叉污染的操作；配制新鲜的试剂，重复测试
无信号值或过低的信号值	试剂配制和使用错误	检查试剂配制浓度是否正确，是否按照顺序使用
	酶标仪使用、设置不正确	提前预热；设置正确的主、次波长读数
	显色时间过短	最佳显色时间应控制在 15-25min
	终止后，未及时读数	加入终止液后，在 5min 内读数
	样本基质效应	使用阳性质控品对照测试
过强的信号值	TMB 底物变质	检查 TMB 底物是否变蓝，使用新的底物试剂
		避免使用金属物质接触底物造成变质失效
	每步实验未更换新的封板膜	每步实验更换新的封板膜
	样本中目标蛋白量过高	预测试，选择适当稀释倍数测试

重复性差	加样量不均一	检查移液器，定期校准
	样本有杂质或沉淀物	样本使用前，请离心样本
	试剂配制未充分混匀	加样前充分混匀试剂

*For research purposes only. Not for therapeutic or diagnostic purposes.