

Human Tumor Necrosis Factor Alpha Detection Kit

Catalog # 6801

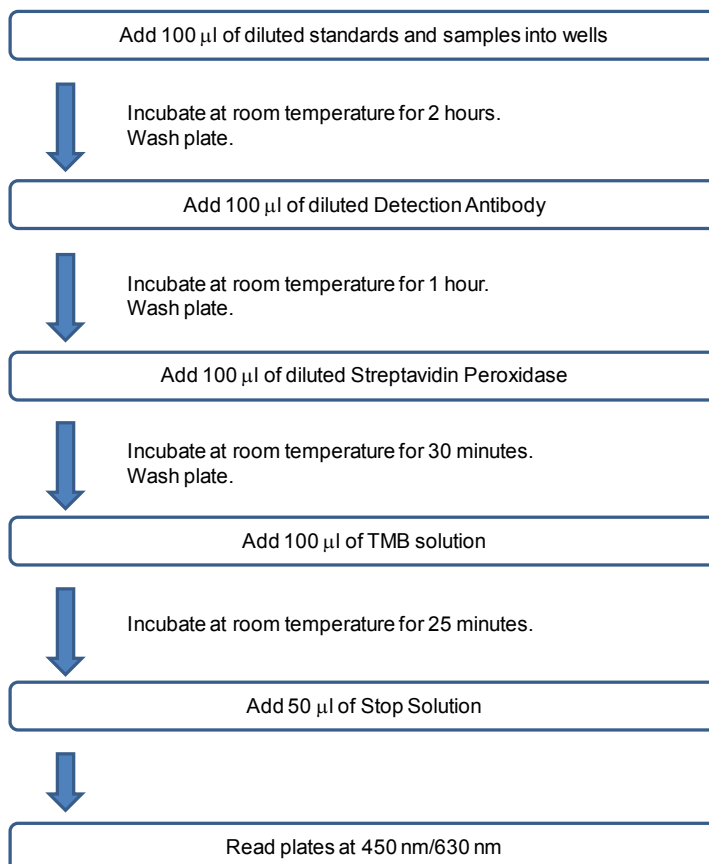
本品は研究用試薬です。研究目的以外の用途には使用できません。

Chondrex, IncのヒトTumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α)定量ELISAキットは細胞培地、血清及び血漿で使用可能です。

キット構成

Item	Quantity	Amount	Storage
TNF- α Standard (68011)	2 vials	1000 pg, lyophilized	-20°C
Detection Antibody (68013)	2 vials	50 μ l	-20°C
Solution B - Sample/Standard/Detection Antibody Dilution Buffer (67015)	1 bottle	50 ml	-20°C
Solution D - Streptavidin Peroxidase Dilution Buffer (9055)	1 bottle	20 ml	-20°C
Streptavidin Peroxidase (9029)	2 vials	50 μ l	-20°C
TMB (90023)	2 vials	0.2 ml	-20°C
Chromogen Dilution Buffer (90022)	1 bottle	20 ml	-20°C
Stop Solution - 2N Sulfuric Acid (9016)	1 bottle	10 ml	-20°C
Wash Buffer, 20X (9005)	1 bottle	50 ml	-20°C
Capture Antibody Coated 96-Well ELISA Plate	1 each	8-well strips x 12	-20°C

測定概要



使用前の注意

Note 1: 標準品及び検体は2重測定を推奨します。

Note 2: すべてのバッファーは使用前に室温に戻してください。

Note 3: 一部使用した試薬は次回の測定まで -20°C で保管してください。

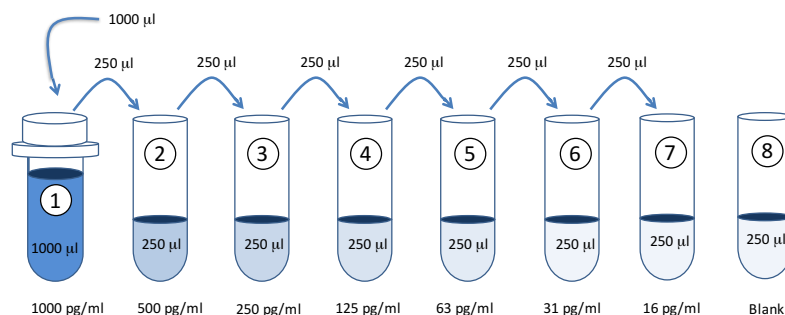
Note 4: Wash Buffer, 20Xは冷蔵保存で結晶の沈殿物が発生することがあります。その場合は加温して結晶を溶解してください。

Note 5: 表示よりも多くの容量のバッファーを含んでおりますので、必要量をピペットで量りとってください。

Note 6: プレートの外周のウエルの乾燥を防ぐために、各工程でプレートシールもしくはサランラップでプレートを覆ってください。

測定方法

- 標準液の調製: 推奨標準液濃度は16 - 1000 pg/mlです。1バイアルのTNF- α Standardに1 mlのSample/Standard/ Detection Antibody Dilution Buffer (Solution B)を加え溶解し、1000 pg/ml溶液を調製します。さらに次のように2倍希釈系列をSolution Bで作製します。250 μl の1000 pg/mlの標準液と等量のSolution Bを混合し、500 pg/ml溶液を作製します。この操作を5回繰り返すことで250, 125, 63, 31 and 16 pg/mlを作製します。残った1000 pg/ml溶液は -20°C で保存し、次回の測定に使用できます。毎回の測定ごとに、希釈標準液を調製してください。



- サンプルの調製:

細胞培地: 細胞の残骸及び不溶性の異物を10,000 rpmで5分間、遠心し除いてください。サンプルをすぐに使用しない場合は -20°C で保存してください。凍結融解は繰り返さないでください。

血清*: 採血後、室温で2時間インキュベートして血餅を作製してください。その後、10,000 rpmで5分間、遠心し上清の血清を得てください。サンプルをすぐに使用しない場合は -20°C で保存してください。凍結融解は繰り返さないでください。

血漿*: ヘパリンのような抗凝固剤を用いて採血後、30分間以内に10,000 rpmで5分間、遠心し上清の血漿を得てください。サンプルをすぐに使用しない場合は -20°C で保存してください。凍結融解は繰り返さないでください。

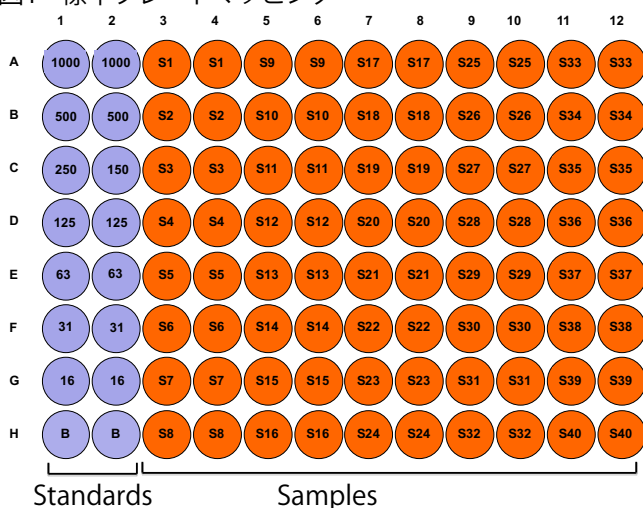
*Note: 脂質を多く含むサンプルは測定に影響を与える可能性がありますので、使用前に10,000 rpmで5分間、遠心して、脂質を分離してからサンプルとして使用してください。

サンプルの希釈: サンプルを10,000 rpmで5分間、遠心し不溶物を除いてください。サンプルはSolution Bで少なくとも1:1に希釈し、サンプル中のTNF- α 濃度に応じて、更に希釈してください。サンプル中のTNF- α 濃度が不明な場合は、2-3の段階希釈を作製することが推奨されます。

Note: サンプルは測定条件を揃えるために必ずSolution Bで希釈してください。

3. 標準液とサンプルの添加: 図1に示したレイアウトを参考に、2重測定で希釈標準液、サンプル及びSolution B (ブランク) 100 μ l をウエルに添加し、室温で2時間インキュベートしてください。

図1 - 標準プレートマッピング



4. 洗浄液の調製: 50 ml の Wash Buffer, 20X を 950 ml の蒸留水と混合し、1 X 洗浄液を調製します。プレートは洗浄瓶もしくはプレート洗浄機を用いて、1 X 洗浄液で少なくとも3回洗浄してください。洗浄ごとにプレートを逆さにし、ペーパータオルの上に置き、プレートをタッピングして、ウエル内の残存液を完全に除去してください。プレートは乾燥させないでください。
5. 検出抗体の調製: 下記の表のとおり Detection Antibody の必要量を Sample/Standard/Detection Antibody Dilution Buffer (Solution B) で調製してください。

Strip #	Detection Antibody (μ l)	Solution B (ml)
2	17	1.7
4	33	3.3
6	50	5.0
8	66	6.6
10	82	8.2
12	100	10.0

希釈検出抗体 100 μ l をすべてのウエルに添加し、室温で1時間インキュベートしてください。

6. 洗浄: プレートを洗浄瓶もしくはプレート洗浄機を用いて、1 X 洗浄液で少なくとも3回洗浄してください。洗浄ごとにプレートを逆さにし、ペーパータオルの上に置き、プレートをタッピングして、ウエル内の残存液を完全に除去してください。プレートは乾燥させないでください。
7. ストレプトアビジンペルオキシダーゼの調製: 下記の表のとおり Streptavidin Peroxidase の必要量を Streptavidin Peroxidase Dilution Buffer (Solution D) で調製してください。

Strip #	Streptavidin Peroxidase (μ l)	Solution D (ml)
2	17	1.7
4	33	3.3
6	50	5.0
8	66	6.6
10	82	8.2
12	100	10.0

希釈ストレプトアビジンペルオキシダーゼ 100 μ l をすべてのウエルに添加し、室温で30分間インキュベートしてください。

8. 洗浄: プレートを洗浄瓶もしくはプレート洗浄機を用いて、1 X 洗浄液で少なくとも3回洗浄してください。洗浄ごとにプレートを逆さにし、ペーパータオルの上に置き、プレートをタッピングして、ウエル内の残存液を完全に除去してください。プレートは乾燥させないでください。

9. TMBの調製: 下記の表のとおりTMBの必要量をChromogen Dilution Bufferで調製してください。調製は使用直前に新しいチューブを用いて行ってください。

Strip #	TMB (μl)	Chromogen Dilution Buffer (ml)
2	34	1.7
4	66	3.3
6	100	5.0
8	132	6.6
10	164	8.2
12	200	10.0

希釈TMB100 μlをすべてのウェルに添加し、室温で25分間インキュベートしてください。

10. 反応停止: 50 μlの 2N Sulfuric Acid (Stop Solution)をすべてのウェルに添加し、反応を停止してください。
11. プレート測定: 450 nmでOD値を測定してください。サンプルのOD値が標準液の最高濃度のOD値よりも高い場合は、サンプルを更に希釈して再測定してください。630 nmはリファレンスとして使用できます。

測定値の計算方法

- 標準液、サンプル及びブランクの2重測定のOD値を平均してください。
- ステップ1で求めた平均のOD値をブランクのOD値平均で差し引いてください。
- 標準液のOD値をTNF-α (pg/ml)でプロットしてください。log/log プロットを用いると直線検量線が作成できます。図2に検量線16 - 1000 pg/mlの範囲でのOD値のプロット例を示しました。
- 回帰分析でサンプル中のTNF-α 濃度をpg/mlとして計算してください。

図2 - ヒトTNF-α ELISAキットの標準曲線例

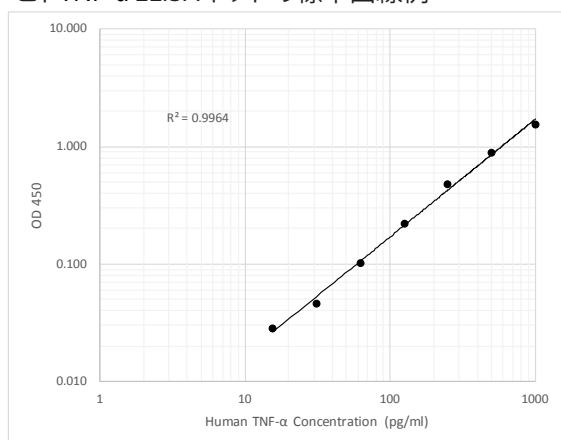


Table 1 - ヒトTNF-α ELISAキットの再現性試験成績

Test	32 pg/ml	125 pg/ml	500 pg/ml
Inter-Assay CV (%)	12.3	5.0	3.8
Intra-Assay CV (%)	13.8	5.6	12.2
Spike Test*	106%	87%	94%

* ヒトTNF-α の既知量を正常ヒト血清に添加後、Sample/Standard/Detection Antibody Dilution Buffer (Solution B) で希釈しサンプルを調製しました。