

Rat Tumor Necrosis Factor Alpha Detection Kit

Catalog # 6901

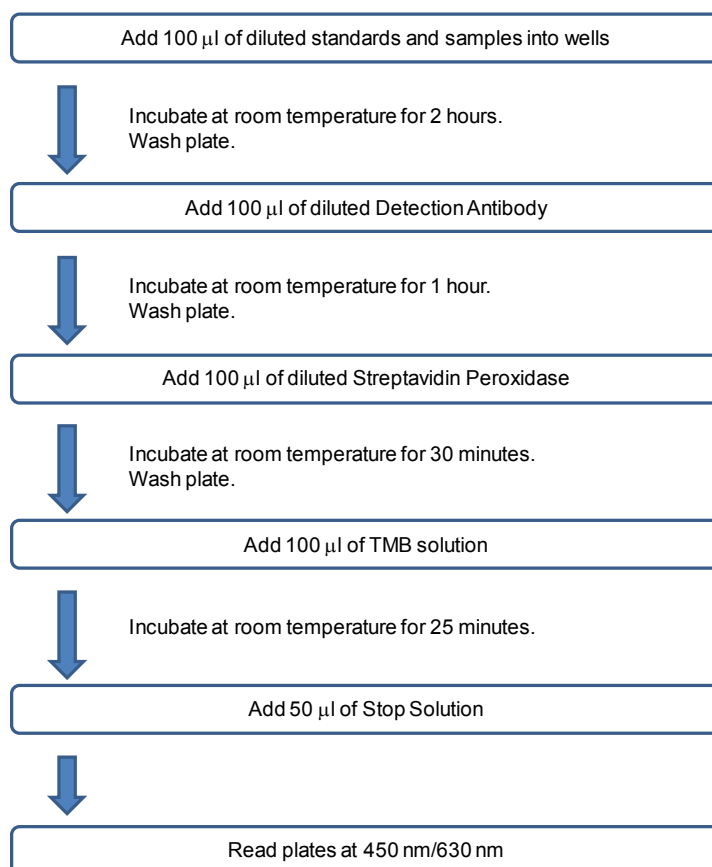
本品は研究用試薬です。研究目的以外の用途には使用できません。

Chondrex, Inc.のラット 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 (69011)	2 vials	5000 pg, lyophilized	-20°C
Detection Antibody (69013)	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。

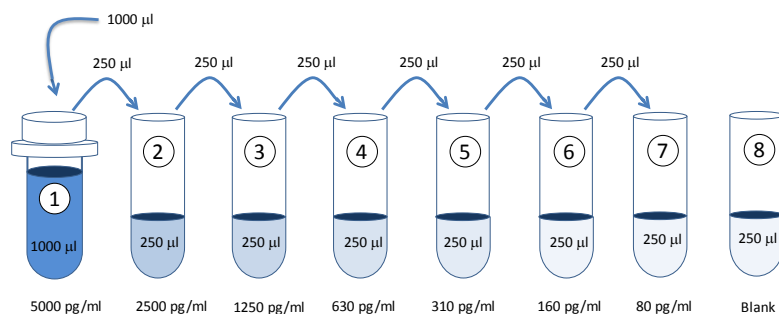
Note 4: Wash Buffer, 20X は冷蔵保存で結晶の沈殿物が発生することがあります。その場合は加温して結晶を溶解してください。

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 $80 - 5000 \text{ pg/ml}$ です。1 バイアルのラット TNF- α Standard に 1 ml の Sample/Standard/Detection Antibody Dilution Buffer (Solution B) を加え溶解し、 5000 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。 $250 \mu\text{l}$ の 5000 pg/ml 標準液と等量の Solution B を混合し、 2500 pg/ml 溶液を作製します。この操作を 5回繰り返すことで $1250, 630, 310, 160$ and 80 pg/ml 溶液を作製します。残った 5000 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。



2. 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 $10,000 \text{ rpm}$ 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、 $10,000 \text{ rpm}$ 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 $10,000 \text{ rpm}$ 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 $10,000 \text{ rpm}$ 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 $10,000 \text{ rpm}$ 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。

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。調製は使用前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 TMB 100 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 80 - 5000 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 - ラット TNF-α ELISA キットの標準曲線例

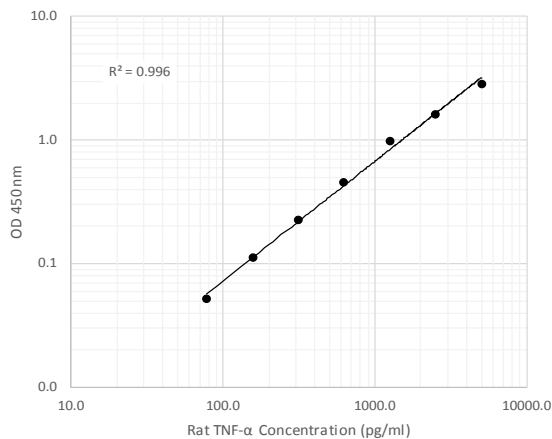


表 1 - ラット TNF-α ELISA キットの再現性試験成績

Test	160 pg/ml	630 pg/ml	2500 pg/ml
Inter-Assay CV (%)	12.7	18.5	20.7
Intra-Assay CV (%)	21.0	3.1	1.1
Spike Test*	88%	90%	94%

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