

小鼠核因子 $\kappa$ B 亚基 p65(NFKB-p65)酶联免疫吸附测定试剂盒

Mouse NFKB-p65(Nuclear Factor Kappa B p65) ELISA Kit

Catalog NO.: RE3044M

使用前请仔细阅读说明书，如有任何问题，可以通过以下方式联系我们：

销售部电话：027-65316809

技术部电话：153-42250750

电子邮箱（销售）：[sales-china@reedbiotech.com](mailto:sales-china@reedbiotech.com)

电子邮箱（技术）：[service@reedbiotech.com](mailto:service@reedbiotech.com)

官方网站：[www.reedbio.cn](http://www.reedbio.cn)

试剂盒的质保时间以及保存温度可见试剂盒外侧标签，请在保质期内使用试剂盒，联系时需要提供产品批号（见试剂盒标签），以便我们更高效地为您服务。

## 目录

用途.....	3
基本性能.....	3
检测原理.....	3
试剂盒组成及保存.....	4
试验所需自备物品.....	5
样品收集方法.....	5
注意事项.....	6
* 试剂盒注意事项.....	6
* 样品注意事项.....	7
样本稀释方案.....	8
检测前准备工作.....	9
操作步骤.....	11
结果判断.....	12
典型数据.....	14
性能.....	14
* 精密度.....	14
* 回收率.....	15
* 线性.....	15
问题分析.....	16
声明.....	17

## 用途

该试剂盒用于体外定量检测小鼠血清、血浆或其它相关生物液体中 NFKB-p65 浓度。

## 基本性能

灵敏度	0.19 ng/mL
检测范围	0.32-20ng/mL
特异性	可检测样本中的小鼠 NFKB-p65, 且与其它类似物无明显交叉反应
重复性	板内, 板间变异系数均 < 10%

## 检测原理

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法。用抗小鼠 NFKB-p65 抗体包被于酶标板上, 实验时样品 (或标准品) 中的小鼠 NFKB-p65 会与包被抗体结合。后依次加入生物素化的抗小鼠 NFKB-p65 抗体和辣根过氧化物酶标记的亲合素, 抗小鼠 NFKB-p65 抗体与结合在包被抗体上的小鼠 NFKB-p65 结合, 生物素与亲合素特异性结合而形成免疫复合物, 游离的成分被洗去。加入显色底物(TMB), TMB 在辣根过氧化物酶的催化下呈现蓝色, 加终止液后变成黄色。用酶标仪在 450nm 波长处测 OD 值, NFKB-p65 浓度与 OD450 值之间呈正比, 通过绘制标准曲线计算出样品中 NFKB-p65 的浓度。

## 试剂盒组成及保存

未拆封的试剂盒可在 2-8 °C 保存 6 个月；如果开封使用后，请按照下表中的条件分别保存各组分。

组分名称	规格	使用后保存条件
ELISA 酶标板 (Micro ELISA Plate)	96T:8 孔×12 条 48T:8 孔×6 条 24T:8 孔×3 条	-20°C, 可存放 6 个月
冻干标准品 (Reference Standard)	96T:2 支 48T:1 支 24T:1 支	
浓缩生物素化抗体 (Concentrated Biotinylated Detection Ab) (100X)	96T:1 支 120μL 48T:1 支 60μL 24T:1 支 60μL	
浓缩 HRP 酶结合物 (Concentrated HRP Conjugate) (100X)	96T:1 支 120μL 48T:1 支 60μL 24T:1 支 60μL	-20°C, 可存放 6 个月
标准品&样品稀释液 (Reference Standard & Sample Diluent)	20mL*1 瓶	2-8°C, 可存放 6 个月
生物素化抗体稀释液 (Biotinylated Detection Ab Diluent)	13mL*1 瓶	
酶结合物稀释液 (HRP Conjugate Diluent)	13mL*1 瓶	
浓缩洗涤液 (Concentrated Wash Buffer) (25X)	30mL*1 瓶	

底物溶液 (Substrate Reagent)	10mL*1 瓶	2-8°C (避光)
反应终止液 (Stop Solution)	10mL*1 瓶	2-8°C,可存放 6 个月
封板覆膜	5 张	常温
产品说明书	1 份	
质检报告	1 份	

**温馨提示：**所有试剂瓶盖须旋紧以防止蒸发和微生物的污染。

试剂体积以实际发货版说明书为准。相关试剂在分装时会比标签上标明的体积稍多一些，请在使用时量取而非直接倒出。

### 试验所需自备物品

1. 酶标仪(450 nm 波长滤光片)
2. 高精度移液器，EP 管及一次性吸头：0.5-10 $\mu$ L, 2-20 $\mu$ L, 20-200 $\mu$ L, 200-1000 $\mu$ L
3. 37°C恒温箱
4. 双蒸水或去离子水
5. 吸水纸
6. 加样槽

### 样品收集方法

(具体处理方法可参考官网：[www.reedbio.cn/www.reedbiotech.cn](http://www.reedbio.cn/www.reedbiotech.cn))

1. 血清：全血样品于室温放置 1 小时或 2-8°C过夜后于 2-8°C，1000 $\times$ g 离心 20 分钟，取上清即可检测。
2. 血浆：抗凝剂推荐使用 EDTA-Na<sub>2</sub>，样品采集后 30 分钟内于 2-8°C，

1000×g 离心 15 分钟，取上清即可检测。

3. 组织匀浆：用预冷的 PBS (0.01M, pH=7.4) 冲洗组织，去除残留血液，称重后将组织剪碎。将剪碎的组织与对应体积的 PBS (一般按 1:9 的重量体积比，比如 1 g 的组织样品对应 9 mL 的 PBS，具体体积可根据实验需要适当调整，并做好记录。推荐在 PBS 中加入蛋白酶抑制剂) 加入玻璃匀浆器中，在冰上充分研磨。为了进一步裂解组织细胞，可以对匀浆液进行反复冻融或超声破碎。最后将匀浆液于 2-8°C, 5000×g 离心 5-10 分钟，取上清检测。

4. 细胞提取液：贴壁细胞用冷的 PBS 轻轻清洗，然后用胰蛋白酶消化，1000×g 离心 5 分钟后收集细胞；悬浮细胞可直接离心收集。收集的细胞用冷的 PBS 洗涤 3 次。每 10<sup>6</sup> 个细胞中加入 150-200μL PBS 重悬(推荐在 PBS 中加入蛋白酶抑制剂；若含量很低可减少 PBS 的体积)并通过反复冻融或超声使细胞破碎。将提取液于 2-8°C, 1500×g 离心 10 分钟，取上清检测。

5. 细胞培养上清或其他生物体液：收集液体后于 2-8°C, 1000×g 离心 20 分钟，除去杂质及细胞碎片。取上清检测。样本处理相关试剂推荐：10×EDTA 抗凝剂、PMSF 蛋白酶抑制剂、0.25%胰蛋白酶溶液。

## 注意事项

### 试剂盒注意事项

- 1) 本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断。
- 2) 试验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。特别是检测血液

或者其他体液样品时，请按国家生物实验室安全防护条例执行。

3) 刚开启的酶标板孔中可能会有少许水样物质，此为正常现象，不会对实验结果造成任何影响。暂时不用的板条应拆卸后放入备用铝箔袋，按照上述表格中保存条件存放。

4) 请勿重复使用已稀释过的标准品、生物素化抗体工作液、酶结合物工作液。未用完的浓缩生物素化抗体(100×)、浓缩 HRP 酶结合物(100×)、酶标板及其他原液按照上述表格中保存条件存放。

5) 检测使用的酶标仪需要安装能检测  $450\pm 2$  nm 波长的滤光片，光密度范围在 0-3.5 之间。建议使用时提前 15 分钟预热。

6) 请勿使用其他批号或其他来源的试剂混合或替代本试剂盒中的试剂。

7) 试验中所用的 EP 管和吸头均为一次性使用，严禁混用。

8) 请勿使用过期的试剂。

#### 样品注意事项

1) 收集血液的试管应为一次性无内毒素试管。避免使用溶血，高血脂样品。

2) 样品收集后若在 1 周内进行检测可保存于  $2-8^{\circ}\text{C}$ ，若不能及时检测，请按一次使用量分装，冻存于  $-20^{\circ}\text{C}$ (1 个月内检测)，或  $-80^{\circ}\text{C}$ (3 个月内检测)，避免反复冻融。在检测前，冷冻过的样本应缓慢地融化并离心除去冻融过程产生的沉淀物。室温混匀后使用。

3) 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待

测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。

4) 若所检样本不在说明书所列样本之中，建议做预实验验证其检测有效性。

5) 若使用化学裂解液制备组织匀浆或细胞提取液，由于引入某些化学物质会导致 ELISA 测值出现偏差。

6) 某些重组蛋白可能与试剂盒中捕获或检测抗体不匹配而出现不能检测的情况。

## 样本稀释方案

如果您的检测样本需要稀释，通用稀释方案参考如下：

稀释 100 倍：一步稀释。取 5 $\mu$ L 样本到 495 $\mu$ L 标准品&样本稀释液内，做 100 倍稀释；

稀释 1000 倍：两步稀释。取 5 $\mu$ L 样本到 95 $\mu$ L 标准品&样本稀释液内，做 20 倍稀释，再取 5 $\mu$ L 20 倍稀释样本到 245 $\mu$ L 标准品&样本稀释液内，做 50 倍稀释，总共稀释 1000 倍；

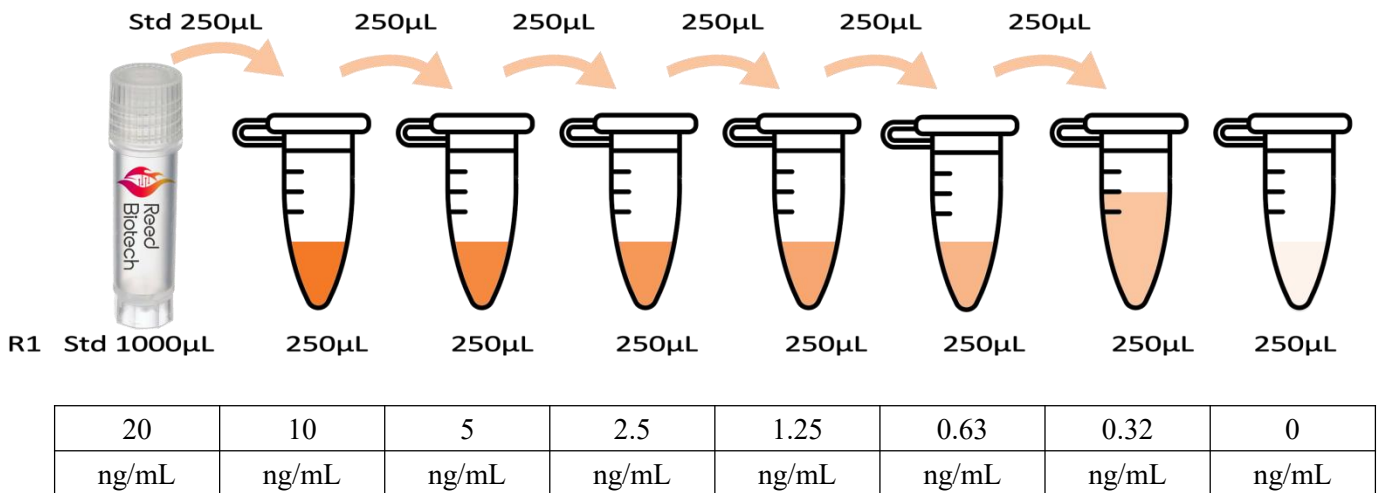
稀释 100,000 倍：三步稀释。取 5 $\mu$ L 样本到 195 $\mu$ L 标准品&样本稀释液内，做 40 倍稀释，再取 5 $\mu$ L 40 倍稀释样本到 245 $\mu$ L 标准品&样本稀释液内，做 50 倍稀释，最后取 5 $\mu$ L 2000 倍稀释样本到 245 $\mu$ L 标准品&样本稀释液内，做 50 倍稀释，总共稀释 100,000 倍；

每步稀释时取液量不少于 3 $\mu$ L，稀释倍数不超过 100 倍。每步稀释都需混合均匀，避免起泡。



## 检测前准备工作

1. 提前 20 分钟从冰箱中取出试剂盒，平衡至室温(18-25°C)。如果试剂盒需分多次使用，请仅取出本次实验所需的酶标板条和试剂，剩余板条和试剂需按照指定条件保存。
2. 洗涤液：将浓缩洗涤液用双蒸水稀释(1:24)。提示：从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶，属于正常现象，可用 40°C水浴微加热使结晶完全溶解后再配制洗涤液。当日使用。
3. 标准品工作液：将标准品于 10000×g 离心 1 分钟，加入标准品&样品稀释液 1mL 至冻干标准品中，旋紧管盖，静置 10 分钟，上下颠倒数次，待其充分溶解后，轻轻混匀，避免起泡，配成 20ng/mL 的标准品工作液(或加入 1mL 标准品&样品稀释液后，静置 1-2 分钟，用低速涡旋仪充分混匀。可通过低速离心去除涡旋过程中产生的气泡)。然后根据需要进行倍比稀释。建议配制成以下浓度：20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.32ng/mL。倍比稀释方法：取 7 支 EP 管，每管中加入 250μL 标准品&样品稀释液，从 20ng/mL 的标准品工作液中吸取 250μL 到第一支 EP 管中混匀配成 10ng/mL 的标准品工作液，按此步骤往后依次吸取混匀。如下页图。提示：最后一管直接作为空白孔，不需要再从倒数第二管中吸取液体。倍比稀释的标准品工作液需要现配现用。



4. 生物素化抗体工作液:实验前计算当次实验所需用量(以  $100\mu\text{L}$ /孔计算), 实际配制时应多配制  $100\text{-}200\mu\text{L}$ 。使用前 15 分钟, 将浓缩生物素化抗体于  $800\times g$  离心 1 分钟, 以生物素化抗体稀释液将  $100\times$  浓缩生物素化抗体稀释成  $1\times$  工作浓度(例如:  $10\mu\text{L}$  浓缩液+ $990\mu\text{L}$  稀释液)。现配现用。

5. HRP 酶结合物工作液: HRP 酶结合物为 HRP 酶结合亲和素。实验前计算当次实验所需用量(以  $100\mu\text{L}$ /孔计算), 实际配制时应多配制  $100\text{-}200\mu\text{L}$ 。使用前 15 分钟, 将浓缩 HRP 酶结合物于  $800\times g$  离心 1 分钟, 以酶结合物稀释液将  $100\times$  浓缩 HRP 酶结合物稀释成  $1\times$  工作浓度(例如:  $10\mu\text{L}$  浓缩液+ $990\mu\text{L}$  稀释液)。现配现用。

## 操作步骤

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. 分别设定标准孔、空白孔和样本孔。标准孔加入 100 $\mu$ L 倍比稀释的标准品，空白孔加入 100 $\mu$ L 标准品&样本稀释液，其余孔加入 100 $\mu$ L 待测样本(建议所有的待检样本和标准品在检测中设立复孔；**建议通过预实验或咨询技术支持确定待检样本的稀释倍数**)。给酶标板覆膜，37 $^{\circ}$ C 孵育 90 分钟。提示：加样时将样品加于酶标板底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀，避免产生气泡。加样时间宜控制在 10 分钟内。
3. 甩尽孔内液体，洗涤 3 次。每个孔中加入生物素化抗体工作液 100  $\mu$ L，酶标板加上新覆膜，37 $^{\circ}$ C 温育 60 分钟。
4. 甩尽孔内液体，在洁净的吸水纸上拍干。每孔加洗涤液 300 $\mu$ L，浸泡 30 秒，吸去或甩掉酶标板内的液体，拍干。重复此洗板步骤 3 次。提示：此处与其他洗板步骤都可使用洗板机(参考北京拓普 DEM-3 型洗板机参数设置：2 点吸，每孔加入洗涤液 300 $\mu$ L，振板 5 秒，吸液 0.5 秒)。洗板完成后请立即进行下步操作，不要让微孔板干燥。
5. 每孔加 HRP 酶结合物工作液 100 $\mu$ L，酶标板加上覆膜，37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟。
6. 甩尽孔内液体，洗板 3 次，方法同步骤 4。
7. 每孔加底物溶液(TMB)100 $\mu$ L，酶标板加上覆膜，37 $^{\circ}$ C 避光孵育 15

分钟左右。提示：根据实际显色情况酌情缩短或延长，但不可超过 30 分钟。当标准孔出现明显梯度时(前 4 个显色孔出现明显蓝色梯度)，即可终止。提前 15 分钟打开酶标仪预热。

8. 每孔加终止液 50 $\mu$ L，终止反应。提示：终止液的加入顺序应尽量与底物溶液的加入顺序相同。

9. 立即用酶标仪在 5 分钟内测定每个孔 450nm 的光密度(OD 值)。如果可以选择校正波长，则设置为 630 nm 或 570 nm。并从 450 nm 的读数中减去 630 nm 或 570 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。

## 结果判断

1. 计算标准品和样本复孔的平均 OD 值并减去空白孔的 OD 值作为校正值。以浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，在双对数坐标轴上拟合四参数逻辑函数的标准曲线。
2. 若样品 OD 值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测并在计算样本浓度时乘以相应的稀释倍数。

## 简要实验操作流程



1、对应板孔中加入100 $\mu$ L标准品工作液或样本，37 $^{\circ}$ C孵育90分钟



2、弃掉板内液体后，洗板3次，加入100 $\mu$ L生物素化抗体工作液37 $^{\circ}$ C孵育60分钟



3、弃掉板内液体后，洗板3次



4、加入100 $\mu$ L HRP酶结合物工作液37 $^{\circ}$ C孵育30分钟



5、弃掉板内液体后，洗板3次，每孔加入100 $\mu$ L TMB底物溶液，37 $^{\circ}$ C避光孵育15分钟



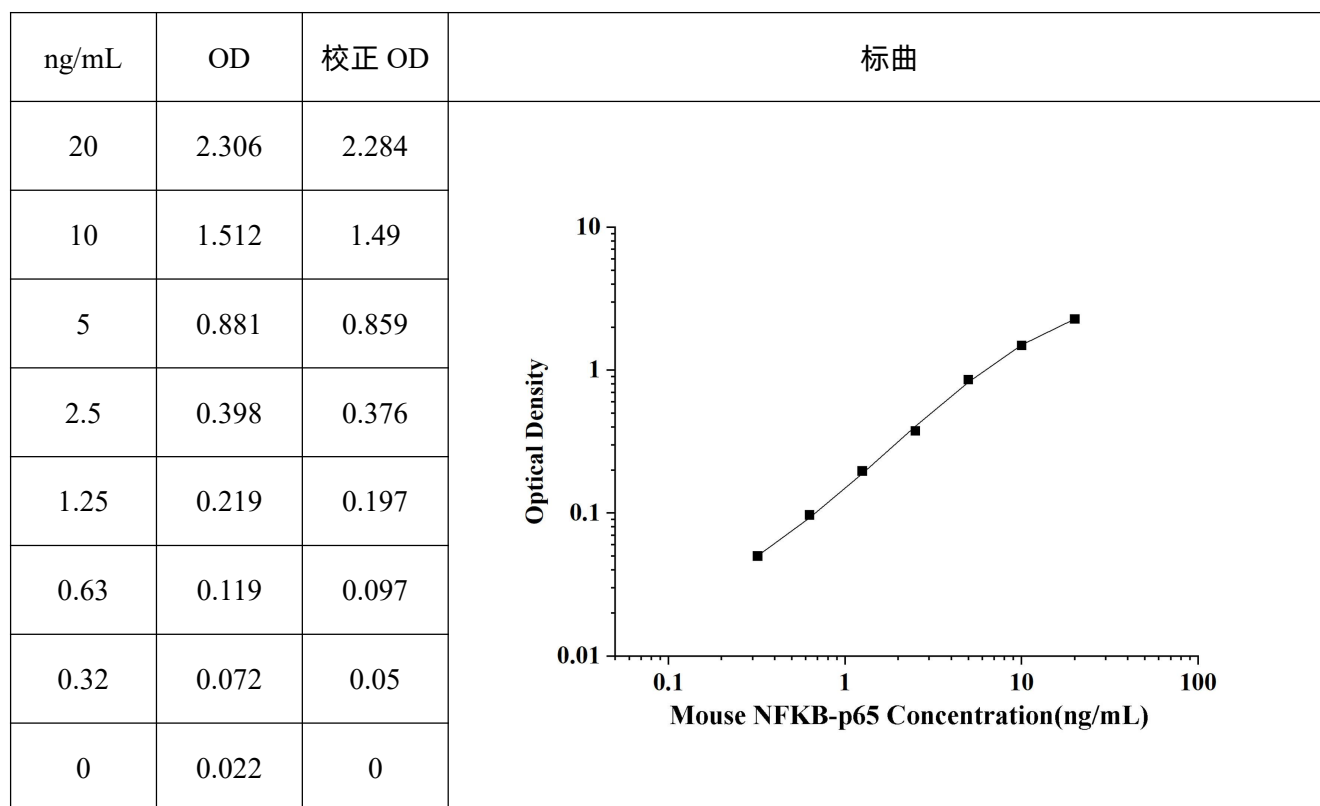
6、每孔加入50 $\mu$ L终止液



7、5分钟内在450nm波长下读数，处理数据

## 典型数据

以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线。



## 性能，精密度

板内精密度：低，中，高浓度样本分别在 1 块板子上检测 20 次。

板间精密度：低，中，高浓度样本分别在 3 块板子上检测 20 次。

样本	板内精密度			板间精密度		
	1	2	3	1	2	3
数量	20	20	20	20	20	20
平均值(ng/mL)	0.61	3.74	8.12	0.47	3.04	10.31
标准差	0.02	0.18	0.48	0.02	0.23	0.51
变异系数 (%)	4.88	3.35	5.75	6.95	4.43	6.88

## 回收率

分别往不同样本中添加已知浓度的小鼠 NF $\kappa$ B-p65, 做回收实验, 得出回收率范围 和平均回收率。

样本类型	回收率范围(%)	平均回收率(%)
血清(n=8)	98-104	102
血浆 EDTA(n=8)	95-107	101
细胞培养基(n=8)	96-104	100

## 线性

将添加有小鼠 NF $\kappa$ B-p65 的样本分别稀释 2 倍, 4 倍, 8 倍, 16 倍做回收实验, 得出回收率范围及平均回收率。

		血清 (n=8)	血浆 EDTA (n=8)	细胞培养基 (n=8)
1:2	回收率范围(%)	85-98	89-101	83-97
	平均回收率(%)	93	94	90
1:4	回收率范围(%)	81-96	89-101	82-103
	平均回收率(%)	84	101	101
1:8	回收率范围(%)	87-98	80-92	81-91
	平均回收率(%)	89	91	88
1:16	回收率范围(%)	92-103	82-93	85-101
	平均回收率(%)	94	86	94

## 简要问题及解决方案

问题	可能原因	解决方法
高背景	孔板洗涤不彻底	按要求充分清洗酶标板, 确保适当的清洗时间和次数。确保每个孔中的洗涤缓冲液量适当
	错误的孵育流程	检查孵育时间孵育温度是否按照要求设置
	样品试剂交叉污染	要小心那些可能会导致交叉污染, 试剂现用现配, 并重复测试。
没有信号或弱信号	不正确使用试剂	检查试剂浓度和稀释比, 确保试剂的使用顺序正确
	酶标仪未正确读数	使用前请提前打开酶标仪预热, 确保设置适当的主波长和校正波长
	显色反应时间不足	最佳显色反应时间应限制在 15-25 分钟
	样品的基质效应	采用阳性对照
信号过强	TMB 底物保存不当	检查 TMB 底物溶液是否变色, 联系厂家补发新的 TMB 底物溶液
	封板覆膜重复使用	在实验的每一步都需要使用新的封板覆膜



	样品中目的蛋白浓度太高	按最佳稀释比例进行样品预实验和稀释
低重复性	加样不均匀	检查换新移液器, 定期校正移液器
	样品中存在杂质与沉淀物	使用前请离心样品
	试剂混合不充分	装载前将所有样品和试剂充分混合

## 声明

1. 限于现有条件及科学技术水平，尚不能对所有原料进行全面的鉴定分析，本产品可能存在一定的质量技术风险。
2. 本试剂盒在研发过程中去除/降低了生物学样本中的一些内源性干扰因素，并非所有可能影响的因素均已去除。
3. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及当时的实验环境等因素密切相关，本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，请使用者使用前充分考虑到样本可能的使用量，预留充足的样本。
4. 为了达到好的实验结果，请只使用本公司试剂盒内提供的试剂，不要混用其他制造商的产品，严格按照说明书操作。
5. 由于操作过程中试剂制备以及酶标仪参数设置不正确，可能导致结果异常，实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器。

6. 即使是相同人员操作也可能在两次独立实验中得到不同的结果，为保证结果的重现性，需要控制实验过程中每一步的操作。
7. 试剂盒发货前会经过严格的质检，然而，因为运输条件、实验设备差异等等因素影响，用户检测结果可能跟出厂数据不一致。不同批次间试剂盒间的差异也可能来自上述原因。
8. 本试剂盒未与其他厂家同类试剂盒或不同方法检测同一目的物的产品进行对比，所以不排除检测结果不一致的情况。
9. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。

12								
11								
10								
9								
8								
7								
6								
5								
4								
3								
2								
1								
	A	B	C	D	E	F	G	H

## 技术资源

微信扫描左下二维码，获得更详细的 ELISA 实验指南和常规问题分析  
如有任何技术问题，请与我司技术支持联系(建议及时对显色结果拍照，  
保留实验数据、所用板条以及未使用的试剂)。



微信公众号



技术支持微信