人肿瘤坏死因子α(TNF-α) VeriQuant 免疫分析试剂盒
Human TNF α VeriQuant Immunoassay Kit
Catalog NO.：VQ1060H

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：15342250750
电子邮箱（技术）：service@reedbiotech.com
官方网站：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（见试剂盒侧面标签），以便我们更高效地为您服务。

用途

VeriQuant™ Human TNF α 免疫分析试剂盒旨在利用 qPCR 仪器体外定量测定血清、血浆或其他生物液体样本中的 Human TNF α 含量。
本方案描述的是使用 **5μL** 样本量，**50μL 反应体系**的 qPCR 实验测试。
如需改变 qPCR 体系，请咨询技术支持或参考 www.reedbio.cn.

基本性能

灵敏度	0.063pg/mL
检测范围	0.256-4000 pg/mL

检测原理

两种识别目标蛋白不同表位的抗体分别偶联特异性的寡核苷酸。当两种抗体同时结合到同一目标蛋白时，两个寡核苷酸靠近。随后通过 Synthesis Enzymes 连接并作为模板，通过特异性引物和 TaqMan 探针进行荧光定量 PCR（qPCR）扩增。荧光信号强度与循环阈值（Ct 值）呈负相关，从而实现对目标蛋白的高特异性和高灵敏度定量检测

试剂盒组成及保存

试剂盒可在-20℃保存 12 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,避免多次冻融。

组分名称	规格	保存条件
Standard	2 支	-20℃
Assay Dilution Buffer	1 瓶 7.5mL	
Antibody-conjugate A	1 支 15μL	
Antibody-conjugate B	1 支 15μL	
Antibody-conjugate Dilution Buffer	1 支 1mL	
Quanti Mixture	1 支 5mL	
Synthesis Enzymes	1 支 30μL	
产品说明书	1 份	常温
质检报告	1 份	

试验所需自备物品

- 实时荧光定量 PCR 仪
- 2 块 96 孔 0.2mL PCR 板（可以用 PCR 八联管，PCR 单管替代）
- 单通道、多通道高精度移液器，离心管及低吸附一次性吸头：0.5-10μL, 2-20μL,20-200μL,200-1000μL
- 恒温箱
- 荧光定量 PCR 封板膜（压敏高粘型）和封板膜刮板或滚轮
- 5mL 加样槽*2 个
- 96 孔低温金属冰盒
- 无酶、无热源的 1.5 mL、5mL 离心管
- 微孔板离心机

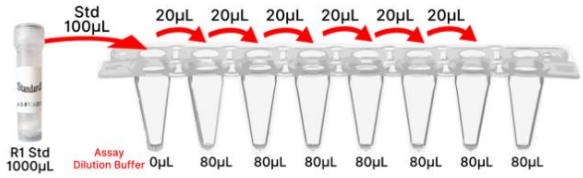
注意事项

1. 检查 VeriQuant™技术指南在 Reedbio.cn 的详细信息，然后再开始操作。
2. 戴上手套，使用无 DNase/无 RNase/无热源的耗材，练习正确的分子实验操作技术。
3. 移液前对离心管进行离心，以确保试剂在管子的底部。
4. 除 Synthesis Enzymes 外，所有试剂在室温下解冻。Synthesis Enzymes（**无需解冻**）和已解冻的试剂实验全程放在冰上保存。
5. 不要涡旋振荡 PCR 板。
6. 使用封板膜刮板或滚轮，以确保荧光定量 PCR 封板膜完全粘附 PCR 板避免蒸发或污染。
7. 规范移液操作，将变异系数（CV）降至最低。
8. 若样本中存在颗粒物，需先离心或过滤，再进行检测实验。

检测前准备工作

1. 配置标曲

① 加入 1mL 检测稀释液(Assay Dilution Buffer)至 1 支冻干标准品管中得到 4000pg/mL 标准品工作液，上下颠倒 5 次混匀，不要涡旋。
② 室温下静置 15 分钟。
③ 准备 **PCR 板 1**（也可用 8 联管代替，用于临时储存所有已经配好的工作液，方便后续多通道移液器操作，标曲稀释需在同一列中进行。PCR 板 1 实验全程需放置在低温金属冰盒上）。
④ 5 倍梯度稀释:在 PCR 板 1 的标准品列中,从第二孔开始,每孔加入 **80μL** 检测稀释液(Assay Dilution Buffer)，为保证梯度稀释准确性，稀释液需离心至孔底部。从 4000pg/mL 标准品工作液吸取 100μL 至第一孔，记为 **S7**。从第一孔吸取 **20μL** 至第二孔，轻柔吹打 10 次混匀得到孔浓度为 800pg/mL 标准品，记为 **S6**，依此逐步稀释至倒数第二孔 **S1**。**注**：最后一孔则作为 **S0** 空白孔，不需要再从 **S1** 管中吸取液体。标准品工作液需现配现用



Standard	Assay Dilution Buffer	Standard curve
S7 100μL	0μL	**S7**:4000pg/mL
S7 20μL	80μL	**S6**:800pg/mL
S6 20μL	80μL	**S5**:160pg/mL
S5 20μL	80μL	**S4**:32pg/mL
S4 20μL	80μL	**S3**:6.4pg/mL
S3 20μL	80μL	**S2**:1.28pg/mL
S2 20μL	80μL	**S1**:0.256pg/mL
/	80μL	**S0**:0pg/mL

2. 将样品稀释 10 倍

在 PCR 板 1 中加入 **5μL** 的样品到 **45μL** 的检测稀释液中(Assay Dilution Buffer)，然后用移液器吹打混匀。

3.配置抗体偶联物混合物

①将下列成分加入 1.5 mL 离心管中(1:1:100):然后通过上下颠倒 10 次混匀。

组分	体积
Antibody-conjugate A	7μL
Antibody-conjugate B	7μL
Antibody-conjugate Dilution Buffer	700μL

②在 PCR 板 1 的一列每孔中加入≥80μL 抗体偶联物混合物。
③使用刮板或滚轮均匀刮压封板膜，确保 PCR 板密封完好。用手掌轻轻拍打板子侧面三次充分混匀。将 PCR 板放入微孔板离心机中,3000g 离心 1min。

4.**配置 qPCR 反应混合物**：将取 **25μL** Synthesis Enzymes 直接加入到 Quanti Mixture 管中轻柔吹打（管中体积为 **5mL**，具体需根据实际用量计算，Synthesis Enzymes 与 Quanti Mixture 体积比为 1:200），并上下颠倒 5 次混匀，得到 qPCR 反应混合物（此混匀步骤应在 A 反应完成之前完成，也可转移至加样槽中，便于下一步使用多通道移液器加样）。

运行实验

A.结合待测物

1. 将 **5 μL** 标准品或稀释后的样品从 PCR 板 1 转移到 **PCR 板 2**（整个实验的反应板）的相应孔中。
2. 用多通道移液器将 **5 μL** 抗体偶联物混合物从 PCR 板 1 转移到 PCR 板 2 的所有检测孔中。用封板膜密封 PCR 板，轻轻拍打 PCR 板侧面混匀，3000 g 离心 1 分钟。在 37℃ 1 小时。

B.执行 qPCR

3. 在 A 反应 PCR 板 2 **所有检测孔**中都加入 **40μL** qPCR 反应混合物。轻柔吹打混匀，避免引入气泡。用 PCR 封板膜密封 PCR 板，使用刮板或滚轮确保封板膜完成粘合。轻轻拍打 PCR 板侧面混匀，3000 g 离心 1 分钟。
4. 在 qPCR 仪上创建一个新的程序。

项目	参数
实验类型	标准曲线或定量标准曲线
报告荧光基团	FAM
淬灭基团	NFQ-MGB *
参比荧光	None
检测孔	全部设为 Unknown
阈值	0.2
基线	15

*对于没有此选项的仪器，请输入“None”或“Non-fluorescent”

5. 程序设定

Step	Temp(°C)*	Time	Stage
Ligation	25	20min	Hold
Inactivation	95	2min	Hold
Denaturation	95	15s	40 cycles
Annealing/extension	60	1min	

*设置变温速率为 **1.6℃/秒**

6.将实验保存为模板，将 PCR 板 2 放入 qPCR 仪中**运行模板**。注意：重复使用保存的模板进行后续检测。

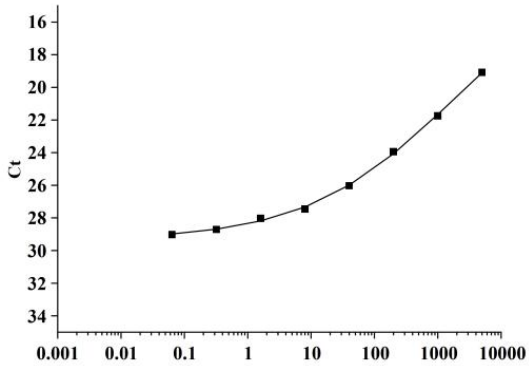
数据分析

1.将运行数据以.ed 或.eds 格式或.csv 格式保存。
2.根据以上得到的实验数据，计算对应标准品复孔的平均 Ct 值，使用 4PL 曲线拟合云计算工具以标准品浓度为横坐标，Ct 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及方程。将样本平均 Ct 值代入标准曲线方程计算得到对应的样本浓度(云计算工具详见 www.reedbio.cn)。

标准曲线示例

本节数据以典型配置为例设置标准曲线。研究人员应该为每次实验重新准备新的标准曲线。

Concentration (pg/mL)	Average Ct
4000	13.984
800	16.37
160	18.77
32	20.985
6.4	23.546
1.28	25.74
0.256	27.225
0	28.041



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，本公司仅对试剂盒本身负责。
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 PCR 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，本公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担。