（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

预览版

（此说明书仅供参考，实际以随货发说明书为准）

小鼠 Toll 样受体 4(TLR4)ELISA 试剂盒
说明书

Mouse TLR4 (Toll Like Receptor 4) ELISA Kit

货号：EM23849

若您在使用过程中遇到任何疑问或需要进一步的帮助，欢迎您通过以下方式联系我们：

✉邮箱（销售）	order@enkilife.cn
✉邮箱（技术支持）	tech@enkilife.cn
公司电话	027-87002838
网址	www.enkilife.cn

订阅微信公众号
获取更多技术信息
及前沿动态

保质期：请见试剂盒外包装标签。

技术支持：为了更好地给您提供服务，联系时请告知产品外包装标签上批号。

用途

该试剂盒用于体外定量检测血清、血浆或其他相关生物液体中Mouse TLR4浓度。

灵敏度、检测范围、特异性和重复性

●灵敏度：0.054ng/mL。

●检测范围：0.15-10ng/mL。

●特异性：可检测样本中的 Mouse TLR4,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 Mouse TLR4 抗体包被于酶标板上，实验时样品（或标准品）中的 Mouse TLR4 会与包被抗体结合。后依次加入生物素化的抗 Mouse TLR4 抗体和 HRP 酶标记的亲和素，抗 Mouse TLR4 抗体与结合在包被抗体上的 Mouse TLR4 结合，生物素与亲和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 HRP 酶的催化下呈现蓝色，加终止液后变成黄色。用酶标仪在 450 nm 波长处测 OD 值，Mouse TLR4 浓度与 OD450 OD 值之间呈正比，通过绘制标准曲线计算出样品中 Mouse TLR4 的浓度。

试剂盒组成及保存

未开封试剂盒应保存在 2-8℃。收到货后请参照下表中保存条件进行存储。

组分名称	**规格**	**保存条件及注意事项**	
酶标板 Micro Plate	96T: 8 孔×12 条	**未拆封：** -20℃, 12 个月	**未用完：** 应放回铝箔袋中密封好，-20℃保存
	48T: 8 孔×6 条		
标准品 Reference Standard	96T: 2 支	**未溶解：** -20℃, 12 个月	每次实验请使用新溶解的标准品，溶解后未用完标准品弃用
	48T: 1 支		
浓缩生物素化抗体(100×) Biotinylated Detection Ab Concentrate (100×)	96T:120μL×1 支	-20℃, 12 个月	**未用完：**浓缩液请密封好后放回-20℃，工作液请丢弃
	48T: 60μL×1 支		
浓缩 HRP 酶结合物(100×) HRP Conjugate Concentrate (100×)	96T:120μL×1 支	-20 ℃ (避 光), 12 个月	**未用完：**浓缩液请密封好后放回-20℃，工作液请丢弃
	48T: 60μL×1 支		
标准品&样品稀释液 Reference Standard & Sample Diluent	20mL×1 瓶	2-8℃, 12 个月	
生物素化抗体稀释液 Biotinylated Detection Ab Diluent	14mL×1 瓶		
HRP 酶稀释液 HRP Conjugate Diluent	14mL×1 瓶		
浓缩洗涤液(25×)	30mL×1 瓶		

Wash Buffer Concentrate (25×)		
底物溶液 TMB Substrate Reagent(TMB)	10mL×1 瓶	2-8℃(避光), 12 个月
终止液 Stop Solution	7mL×1 瓶	2-8℃/常温
封板覆膜	5 张	
产品说明书	1 份	
质检报告	1 份	

说明:
保存时请确保所有试剂瓶的瓶盖都旋紧，以防止试剂蒸发和避免微生物污染。
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。

ⓘ检测前注意事项

1. 试验中请穿戴好防护装备，接触血液样本或其它生物样本时，请参照国家生物实验室安全防护条例做好生物安全防护工作。
2. 不同批号的试剂盒组份不能混用(Stop Solution除外)。
3. 试验中所用的EP管和吸头均为一次性使用，请勿混用。
4. 刚开封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影响。暂时不用的板条应放入备用铝箔袋，按照组分表中保存条件进行存放。
5. 已稀释过的标准品及生物素化抗体工作液、酶结合物工作液请勿重复使用。
6. 未用完的浓缩生物素化抗体(100×)、浓缩HRP酶结合物(100×)及其它原液请按照组分表中的保存条件进行存放。
7. 酶标仪需要安装能检测450±10nm波长的滤光片，检测范围在0-3.5之间。

⍰检测前自备物品

1. 酶标仪（450nm波长滤光片）、37℃恒温孵育箱。
2. 1.5mL EP管、吸水纸。
3. 移液器及一次性吸头：0.5-10μL, 2-20μL, 20-200μL, 200-1000μL。
4. 双蒸水或去离子水。

样本处理

ⓘ样品收集方法参考

不同样本处理时会有一定差异，在选择样本制备前，应充分了解样本自身特性，并尽可能规避样本处理过程中所使用试剂对后续实验的影响。同时避免样本在不合理的温度及时间下停留。以下处理方法仅供参考，更多样本处理及注意事项请见官网《ELISA样本制备指南》。

样本处理方法建议：

血清与血浆因凝血过程导致成份上有一定差异，在选择制备之前应充分了解并考虑待测蛋白在血清血浆中含量差异。可参考Enkilife官网《ELISA样本制备指南》。

1. **血清：**使用血清分离管（SST），让样本在室温下凝血30分钟，然后以1000 x g的离心力离心15分钟。取出血清，立即进行检测或分装储存在≤-20°C。避免反复冻融。避免使用高血脂样品。
2. **血浆：**使用EDTA或肝素作为抗凝剂（建议使用带抗凝剂的采血管），样品采集后轻轻使其与抗凝剂充分混合，30分钟内于1000×g离心15分钟，取上清即可检测。短期保存可置于2-8°C。制备过程应轻拿轻放，使用无菌器具，以避免溶血。同时应避免使用高血脂样品。
3. **组织匀浆：**

3.1将目标组织置于冰上，剪碎后，用预冷的PBS (0.01M, pH=7.4)冲洗组织，去除残留血液，称重备用。

3.2将剪碎的组织与预冷的PBS按一定质量体积比(1g组织样品加入9mL的PBS，具体比例可根据实验需要适当调整。推荐在PBS中加入蛋白酶抑制剂，例如PMSF，以抑制匀浆过程释放的蛋白酶活性，避免目标蛋白被酶解)加入玻璃匀浆器中，在冰上充分研磨。

3.3为了进一步裂解组织细胞，可对匀浆液进行超声破碎（注意使用冰浴降温，并控制好超声功率及时间，避免蛋白变性及过多自由基产生）。最后将匀浆液5000×g离心5-10分钟，取上清检测。

注意：

A.一些组织样本（如肝脏、肾脏、胰腺）含有较高浓度的内源性过氧化物酶，其会与TMB底物反应导致假阳性。在这种情况下，可尝试将组织剪碎后，使用3% H_2O_2完全浸泡组织10-15分钟，用预冷PBS将残留H_2O_2冲洗干净，正常进行匀浆后检测。

B.也可尝试使用温和的裂解液促进组织裂解及胞内蛋白的释放。但应尽量避免使用含Triton X-100、NP-40或SDS等表面活性剂的裂解液，在没有蛋白酶抑制剂情况下，它们会促进溶酶体破裂进而导致蛋白酶被更多释放进组织匀浆液中，降解目标蛋白，影响检测准确度。同时其过高含量还会严重干扰试剂盒反应。在物理裂解效果不好情况下，可尝试使用EnkiLife新一代裂解液，RC0005 Cell/Tissue Lysis Buffer进行裂解。

4. **细胞提取液**：

细胞收集：

贴壁细胞收集：用预冷的PBS沿培养皿壁轻轻清洗两次，去除培养基。然后使用胰蛋白酶（推荐使用EnkiLife RC0001 胰酶细胞消化液）对贴壁细胞进行消化，使其从培养皿表面脱落，1000×g离心5分钟，收集细胞。

悬浮细胞收集：1000×g离心5分钟收集细胞。

半悬浮半贴壁细胞：取上清按悬浮细胞收集方法收集悬浮液细胞。然后按贴壁细胞收集方法收集贴壁细胞，将两者收集细胞使用PBS重悬，混匀后，1000×g离心5分钟即可完成收集。

细胞破碎：

将收集的细胞用预冷的PBS洗涤3次。每10^6个细胞中加入150-200μL PBS重悬并通过超声(参考设置：冰浴，3-5mm探头，150-300W，每次工作1-2秒，间隔30秒，3-5次循环)使细胞破碎(若蛋白含量很低可减少PBS的体积)。将提取液于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1000×g离心20分钟，除去杂质及细胞碎片。取上清检测。

ⓘ样品注意事项

1.样品收集后保存说明：

1周内检测：2-8℃，保存。

1个月内检测：请分装成单次使用量，并保存于-20℃。

3个月内检测：请分装成单次使用量，并保存于-80℃。

所有样本应避免反复冻融。

2.请留意，您样本的浓度范围可能超过试剂盒的检测范围。如遇此情况，建议先进行预实验，以确定合适的稀释比例，确保结果的准确性。(建议查阅文献后先做预实验，以确定稀释倍数)

3.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。

4.若使用化学裂解液制备组织匀浆或细胞提取液，由此引入的某些化学物质可能会导致测值结果出现偏差。

5.请知悉，部分重组蛋白可能与试剂盒中的捕获或检测抗体不匹配，导致无法检测。

♢检测前准备工作

1.**平衡至室温：**将试剂盒提前20分钟取出冰箱，使其平衡至室温。

2.**酶标仪预热：**检测时，请至少提前15分钟打开酶标仪，使酶标仪光源稳定。

3.**洗涤液制备：**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℃水浴微加热使结晶完全溶解后再配制洗涤液。当日使用。

4.**标准品工作液制备：**

4.1 将**标准品**于10000×g离心1分钟。

4.2 用标准品&样品稀释液将标准品稀释，得到指定浓度标准品工作液。

注意：最后一管作为空白对照。加入**标准品&样品稀释液**即可。

5.**生物素化抗体工作液制备：**

计算用量：以100μL/孔的试剂需求量进行计算，并额外增加100-200μL，以备不时之需。

抗体稀释：

在实验前15分钟，使用生物素化抗体稀释液将**浓缩生物素化抗体(100×)**稀释并混匀至1×工作浓度。稀释后的抗体应于当日使用，以保证实验效果。

6.**酶结合物工作液：**

计算用量：以100μL/孔的试剂需求量进行计算，并额外增加100-200μL，以备不时之需。

抗体稀释：在实验前15分钟，使用HRP酶稀释液将**浓缩HRP酶结合物(100×)**稀释并混匀至1×工作浓度。稀释后的抗体应于当日使用，以保证实验效果。

实验操作过程

1. **加标准品&样品：**

   将不同浓度**标准品工作液**按从上到下顺序加入到前两列酶标板孔中，每个浓度两孔，每孔100μL；待测样品加入其余孔，每孔100μL。高浓度样品需先稀释。

   操作时，从酶标板底部加样，避免接触孔壁，轻轻晃动混匀，避免产生气泡，加样操作控制在10分钟内完成。

2. **覆板&孵育：**

   撕开封板覆膜，将板孔覆盖紧密。37℃孵育90min。

3. **加生物素化抗体：**

   撕开覆膜，清除并甩干板孔内液体，无需洗涤。

   按100μL/孔向所有孔加入稀释好的**生物素化抗体工作液。**轻轻晃动混匀，覆盖**酶标板覆膜。**37℃孵育60min。

4. **洗板1：**

   手动洗板方法：

   清除并甩干板孔内液体，按350μL/孔，加入稀释好的**洗涤液**，浸泡1-2min，清除并甩干板孔内液体，在厚吸水纸上拍干板孔，完成一次洗涤。

   总计洗板3次。甩干板孔液体供下一步使用。

   洗板机参数建议：350μL/孔，振板3-5S，两点吸液。

5. **加酶结合物工作液：**

   按100μL/孔向所有孔加入稀释好的**酶结合物工作液。**轻轻晃动混匀，覆盖**酶标板覆膜。**37℃孵育30min。

6. **洗板2：**

   洗板5次，步骤同第4步**洗板1**操作。

7. **加底物溶液(TMB)：**

   按90μL/孔向所有孔加入**底物溶液(TMB)。**覆盖**酶标板覆膜。**37℃，避光孵育15min左右。

   提示：根据显色情况调整孵育时间，但不要超过30分钟。一旦标准孔显示出清晰的梯度，即可停止孵育。

8. **终止反应：**

   按50μL/孔，向所有孔加入**终止液**，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. 测量OD值：

立即用酶标仪在450nm波长测量酶标板各孔的OD值(光密度)。

检测结果计算

1. 计算平均OD值并绘制标准曲线：

计算每组标准品复孔的平均OD值。

从每个标准品的平均OD值中减去空白孔的OD值，得到标准品矫正OD值。

以浓度为横坐标，OD值为纵坐标，使用Logistic函数绘制标准曲线。绘制时排除空白组的OD值。

2. 样本浓度计算：

将样本测得的OD值带入曲线中即可求出样本OD值对应浓度。样本若有稀释倍数，在所得浓度上乘以稀释倍数即可得到样本原液浓度。

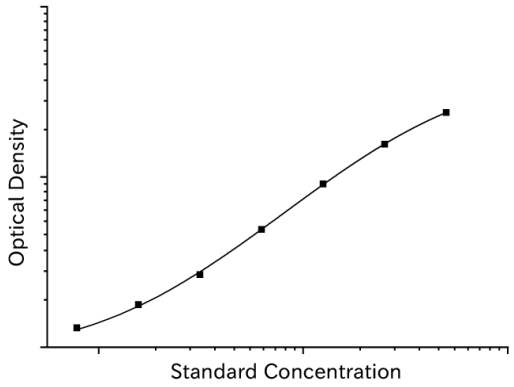
3. 高OD值样品处理：

如果样品的OD值超过了标准曲线的上限，应适当稀释样品后重新测量。

技术数据

典型数据

以下数据仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线。



精密度

板内精密度: 在一块板子上分别对低、中、高浓度的样本各进行20次检测。

板间精密度: 在三块不同的实验板上，对低、中、高浓度样本各进行20次检测。

	批内变异系数			批间变异系数		
样本	1	2	3	1	2	3

数量	20	20	20	20	20	20
平均值(ng/mL)	0.54	1.09	4.89	0.56	1.04	4.95
标准差	0.03	0.05	0.27	0.03	0.05	0.27
变异系数（%）	5.34	4.44	5.46	0.03	4.97	5.49

回收率

向5个不同样本中分别添加已知浓度的目标蛋白，进行回收实验，以确定回收率的范围和计算平均回收率

样本类型	回收率范围（%）	平均回收率（%）
血清（n=5）	89-100	94
血浆（n=5）	90-107	98
细胞培养基（n=5）	85-99	92

线性

首先，向5个样本中分别添加已知浓度的目标蛋白，并进行回收实验，以测定回收率的范围和平均回收率。随后，将这5个样本分别稀释至2倍、4倍、8倍和16倍的浓度，再次进行回收实验，以评估不同稀释倍数下的回收率范围和平均回收率。

		血清 (n=5)	血浆 (EDTA)(n=5)	细胞上清 (n=5)
1:2	回收率范围(%)	84-95	91-106	89-103
	平均回收率(%)	90	97	95
1:4	回收率范围(%)	80-94	86-99	85-98
	平均回收率(%)	86	97	91
1:8	回收率范围(%)	84-97	89-104	89-103
	平均回收率(%)	91	97	91
1:16	回收率范围(%)	86-100	85-98	90-104
	平均回收率(%)	92	92	98

ⓘ问题分析

如果实验结果不理想，请立即拍摄显色结果的照片，保存所有实验数据，并保留使用过的板条以及未用尽的试剂。之后，请联系我们的技术支持团队，以便我们协助您解决问题。同时，您也可以查阅以下资料以获取更多帮助。

问题描述	可能原因	相应对策
标准曲线梯度差	吸液或加液不准	检查并校准移液枪及吸头
	标准品稀释不正确	溶解标准品时轻轻旋转瓶身，确保粉末完全溶解

	洗涤不完全	确保洗涤时间和次数，以及每孔的加液量
显色很弱或无色	孵育时间太短	保证充足的孵育时间
	实验温度不正确	使用推荐的实验温度
	试剂体积不够或漏加	检查吸液及加液过程，确保按顺序足量添加
	稀释不正确	重新检查稀释步骤
	酶标记物失活或底物失效	混合酶结合物和底物，通过显色结果判断
读数数值低	酶标仪设置不正确	检查酶标仪的波长及滤光片设置，确保是450nm
		提前打开酶标仪预热15min及以上
变异系数大	加液不正确	检查加液情况，确保准确性
背景值高	检测抗体的工作浓度过高	使用推荐的稀释倍数
	酶标板洗涤不完全	保证每步清洗完全；如果用自动洗板机，请检查所有的出口是否有堵塞；是否使用试剂盒配备的洗涤液
	洗液有污染	使用新鲜的洗液
灵敏度低	ELISA 试剂盒保存不当	按说明书要求保存试剂
	读数前未终止	OD 读数前向所有孔加入终止液

产品使用声明：

1. **质量技术风险提示：** 受限于当前科学技术水平和条件限制，尚无法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。
1. **实验结果影响因素：** 实验结果受试剂有效性、操作者技能和实验环境等多种因素影响。为确保结果准确性，请准备充足的待测样品。
2. **试剂使用指南：** 为获得最佳实验效果，建议仅使用本试剂盒内提供的试剂，并严格按照说明书操作。避免与其他制造商的产品混用。
3. **操作注意事项：** 不正确的试剂配制或酶标仪参数设置可能导致实验结果异常。请在实验前仔细阅读说明书，并正确调整仪器参数。
4. **结果重现性：**即使是同一操作者，在两次独立实验中也可能得到不同结果。为确保结果的重现性，请严格控制实验过程中的每一步操作。
5. **质量保证与差异说明：** 尽管试剂盒在发货前经过严格质检，但由于运输条件、实验设备差异等因素，用户检测结果可能与出厂数据存在差异。不同批次试剂盒间的差异也可能源于上述原因。
6. **该试剂盒仅用于科研，不得用于临床诊断！**

我们始终致力于提供高质量的产品，并感谢您的理解与支持。如有任何问题，欢迎随时联系我们的技术支持团队。