

Human TNF- α ELISA Kit

使用前请仔细阅读说明书

目录号: NE104

保存: 2~8℃避光保存1年



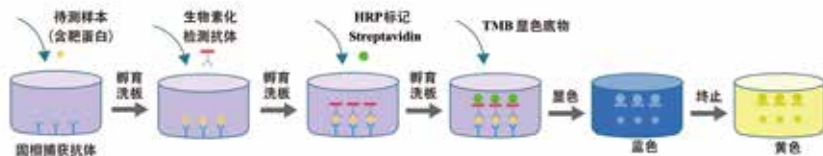
目录

1.	产品说明.....	1
2.	产品适用性.....	1
3.	试剂盒组成.....	2
4.	自备材料设备.....	2
5.	样本收集.....	2
6.	样本稀释.....	3
7.	工作液配制.....	3
8.	操作步骤.....	4
9.	酶标板孔加样示意图.....	5
10.	结果分析.....	5
11.	参考数据.....	6
12.	精密度.....	6
13.	回收率.....	6
14.	线性.....	7
15.	校准.....	7
16.	灵敏度.....	7
17.	样本值.....	7
18.	特异性.....	7
19.	注意事项.....	8



产品说明

肿瘤坏死因子 α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α), 是一种多功能的细胞因子, 主要由活化的巨噬细胞和单核细胞产生并分泌, 能够直接杀伤肿瘤细胞而对正常细胞无明显毒性。TNF- α 还具有多种免疫调节作用, 作为一种内源性热原, 能够诱导发烧, 细胞死亡, 恶病质, 炎症并抑制肿瘤发生和病毒复制, 并通过细胞产生 IL-1和IL-6对败血症做出反应。TNF- α 的表达失调与多种疾病有关, 如感染、自身免疫性疾病、癌症、动脉粥样硬化、阿尔茨海默病、炎症性肠病和椎间盘退变等。本试剂盒采用双抗体夹心ELISA法定量测定人血清、血浆和细胞培养上清中的 TNF- α 含量。本试剂盒采用高亲和力的抗人TNF- α 抗体预包被酶标板, 将标准品/待测样本加入微板孔中, 经过孵育后样本中存在的TNF- α 会与酶标板上的预包被抗体特异性结合。洗涤去除未结合物后, 将生物素标记的抗人TNF- α 检测抗体加入微板孔中, 再次孵育后检测抗体会与锚定在酶标板上的TNF- α 特异性结合。随后, 将辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(Streptavidin-HRP)加至微孔板中并孵育, 通过检测抗体上的生物素和链霉亲和素发生的高强度非共价结合, 形成“包被抗体-人TNF- α 蛋白-检测抗体-Streptavidin-HRP”免疫复合物。再次洗涤后, 将显色底物TMB加至微板孔中, HRP会催化TMB底物生成蓝色产物, 颜色反应的深浅将与样本中TNF- α 的浓度成正相关。而后加入终止液终止反应, 在450 nm波长(参考波长570 - 630 nm)处测定吸光度值。通过绘制标准曲线, 由样本吸光度值可计算出样本中所含TNF- α 浓度。本试剂盒特异性强、检测灵敏度高, 同时操作更加便捷。



双抗体夹心ELISA原理示意图

产品适用性

细胞培养上清、血清、血浆等。



试剂盒组成

Component	NE104-01	Storage
人TNF- α 抗体预包被酶标板	96 T	2~8°C
人TNF- α 标准品	2瓶	2~8°C
标准品&样本稀释液	15 ml/瓶	2~8°C
100 $\times$ 人TNF- α 检测抗体	120 μ l/支	2~8°C
100 $\times$ Streptavidin-HRP	120 μ l/支	2~8°C (避光)
检测抗体&Streptavidin-HRP稀释液	25 ml/瓶	2~8°C
20 $\times$ 洗液	50 ml/瓶	2~8°C
TMB显色底物	12 ml/瓶	2~8°C (避光)
终止液	6 ml/瓶	2~8°C
封板膜	4张	

注意：试剂盒在开封的条件下，2~8°C可储存1个月；未开封试剂盒请在有效期1年内使用。

自备材料设备

1. 酶标仪：主波长450 nm，参考波长620 nm；
2. 去离子水；
3. 实验过程中用到的EP管、移液器、吸头、量筒等；
4. 微孔板震荡器；
5. 自动洗板机或8道手动洗瓶或多道移液器。

样本收集

1. 细胞培养上清：收取细胞培养上清，300 $\times$ g，4°C离心10分钟，将上清等量分装于EP管中并保存于-20°C，避免反复冻融（24小时内检测可于2~8°C保存）。
2. 血清样本：血液室温自然凝固30分钟后，1000 $\times$ g，4°C离心10分钟，然后将上清等量分装于EP管中并保存于-20°C，避免反复冻融（24小时内检测可于2~8°C保存）。
3. 血浆样本：抗凝剂推荐使用EDTA或柠檬酸钠。将全血收集到含抗凝剂的采血管中，混匀后室温放置至少20分钟，1000 $\times$ g，4°C离心10分钟，然后将上清等量分装于EP管中并保存于-20°C，避免反复冻融（24小时内检测可于2~8°C保存）。



注意：溶血、高血脂的血清、血浆样本可能会影响检测结果的准确度，应尽量避免使用。

样本稀释

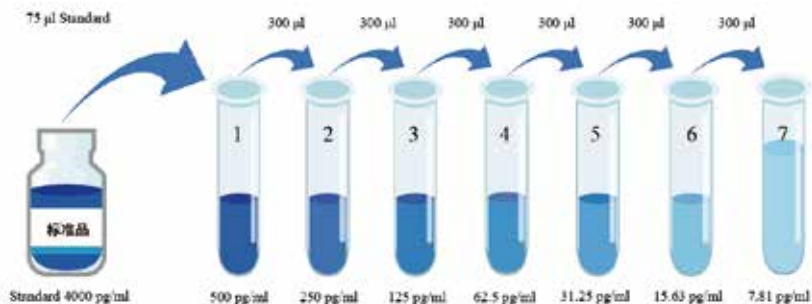
1. 血清/血浆样本需要用标准品&样本稀释液2倍稀释后进行检测，例如：
100 μ l血清+100 μ l 标准品 &样本稀释液。
2. 若细胞培养上清样本阳性值在曲线范围内，不用稀释液稀释，可用原液直接检测；若阳性值超出曲线范围，需要用标准品&样本稀释液稀释到曲线范围内进行检测，计算浓度时应乘以相应稀释倍数。
3. 建议正式实验前做预实验以确定稀释倍数。

工作液配制

配制前请将所有试剂恢复至室温。20 $\times$ 洗液若出现结晶，放37 $^{\circ}$ C温浴至结晶全部溶解。

- 1) **1 $\times$ 人 TNF- α 检测抗体**：使用前点甩离心，使管壁上的液体集中在管底。按当次实验所需用量，用检测抗体&Streptavidin-HRP稀释液将100 $\times$ 人 TNF- α 检测抗体稀释至1 $\times$ 工作浓度。配制完成后需在15分钟内使用。
- 2) **1 $\times$ Streptavidin-HRP**：使用前点甩离心，使管壁上的液体集中在管底。按当次实验所需用量，用检测抗体&Streptavidin-HRP稀释液将100 $\times$ Streptavidin-HRP稀释至1 $\times$ 工作浓度。配制完成后需在15分钟内使用。
- 3) **1 $\times$ 洗液**：按当次实验所需用量，用去离子水将20 $\times$ 洗液稀释至1 $\times$ 工作浓度。配制完成后可在2~8 $^{\circ}$ C保存30天。
- 4) **人 TNF- α 标准品溶解**：根据标准品标签上标注的溶解体积，用相应体积的标准品&样本稀释液对冻干标准品进行溶解，复溶后标准品的浓度为4000 pg/ml，复溶后的标准品请在30分钟内使用。
- 5) **标准品梯度稀释**：用标准品&样本稀释液将复溶后的标准品稀释8倍，即取复溶后的标准品75 μ l，加入到525 μ l标准品&样本稀释液中，充分混匀，记为1号管，此时1号管的浓度为500 pg/ml；然后按照下图进行2倍梯度稀释，在2-7号管中分别加入300 μ l标准品&样本稀释液；取300 μ l 1号管液体加入至2号管，此时2号管的浓度为250 pg/ml，混匀后取300 μ l加入至3号管，此时3号管的浓度为125 pg/ml，以此类推梯度稀释至7号管（7.81 pg/ml）。500 pg/ml作为标准曲线的最高点，标准品&样本稀释液作为标准曲线的零点（0 pg/ml），即空白值。



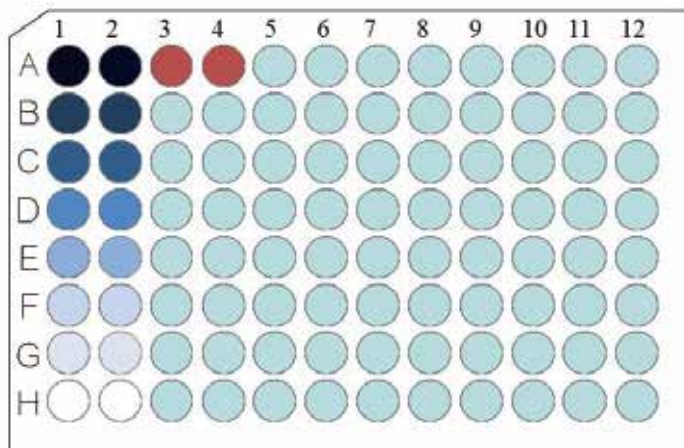


操作步骤

1. 检测前请将所有试剂恢复至室温。取出当次实验所需板条，未用的板条请及时放入铝箔袋中封口，2~8℃保存。
2. 将稀释好的标准品及样本分别加入到对应的板孔中，100 µl/孔，在微孔板震荡器上震荡30秒混匀，盖好封板膜后室温孵育2小时；标准品和样本建议做复孔检测，且加入试剂的顺序应保持一致，使各复孔测试结果一致。
3. 弃掉孔内液体，用1×洗液洗板，300 µl/孔，每次洗板时建议先在微孔板震荡器上震荡30秒后，弃掉孔内洗液。重复操作5次，末次在吸水纸上拍干。
4. 在所有板孔中加入1×检测抗体，100 µl/孔，在微孔板震荡器上震荡30秒混匀，盖好封板膜后室温孵育1小时。
5. 重复步骤3。
6. 在所有板孔中加入1×Streptavidin-HRP，100 µl/孔，在微孔板震荡器上震荡30秒混匀，盖好封板膜后室温孵育30分钟。
7. 重复步骤3。
8. 在所有板孔中加入TMB显色底物，100 µl/孔，在微孔板震荡器上震荡30秒混匀，盖好封板膜后室温孵育20分钟。
9. 孵育完成后加入终止液，50 µl/孔，在主波长450 nm，参考波长620 nm的波长下进行读数。
10. 实验完毕后将未用完的试剂及酶标板外框放回试剂盒并于2~8℃储存，建议1个月内用完。



酶标板孔加样示意图



注：A1/A2：100 μ l 500 pg/ml标准品

B1/B2：100 μ l 250 pg/ml标准品

C1/C2：100 μ l 125 pg/ml标准品

D1/D2：100 μ l 62.5 pg/ml标准品

E1/E2：100 μ l 31.25 pg/ml标准品

F1/F2：100 μ l 15.63 pg/ml标准品

G1/G2：100 μ l 7.81 pg/ml标准品

H1/H2：100 μ l 0 pg/ml标准品（即标准品&样本稀释液）

A3/A4：100 μ l 样本

结果分析

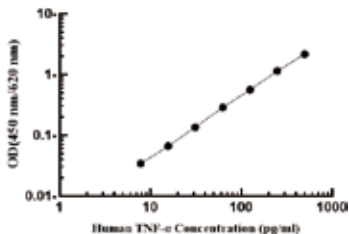
1. 用酶标仪进行双波长检测，测定主波长450 nm和参考波长620 nm的OD值。OD值为450 nm的OD测定值减去620 nm的OD测定值。
2. 计算标准品复孔的平均OD值，然后减去空白值（0 pg/ml标准品的平均OD值），得到标准品的校正值。以标准品的浓度为横坐标，OD校正值为纵坐标，用直线回归或四参数法生成标准曲线。
3. 通过样本OD值和标准曲线方程计算样本浓度。若样本OD值高于标准曲线上限，应进行适当稀释后重测，计算浓度时应乘以相应稀释倍数。



参考数据

每次检测均需建立标准曲线，以下数据仅作为建立标准曲线的参考数据。

标准品 pg/ml	OD值		平均值	校正值
500	2.192	2.187	2.1895	2.160
250	1.19	1.148	1.169	1.140
125	0.594	0.588	0.591	0.562
62.5	0.322	0.308	0.315	0.286
31.25	0.168	0.16	0.164	0.135
15.63	0.095	0.095	0.095	0.066
7.81	0.067	0.059	0.063	0.034
0	0.031	0.028	0.0295	0.000



标准品复孔结果数据解读：上表中0 pg/ml标准品两个复孔的平均OD值为 $(0.031+0.028)/2=0.0295$ ，校正值定为0。500 pg/ml标准品两个复孔的平均OD值为 $(2.192+2.187)/2=2.1895$ ，则其校正值为 $2.1895-0.0295=2.160$ 。

精密度

板内精密度

用3个已知浓度的样本在一块酶标板上测定20个重复孔，以此评估板内的精密度。

板间精密度

用3个已知浓度的样本在不同酶标板上测定20个重复孔，以此评估板间的精密度。

	板内			板间		
	1	2	3	1	2	3
平均值(pg/ml)	204.9	100.1	48.1	218.9	105.3	48.5
标准差	3.2	1.8	1.9	5.2	5.1	1.9
变异系数 (%)	1.6	1.8	4.0	2.4	4.8	3.9

回收率

在4份健康人的血清、血浆及细胞培养上清中加入不同浓度的人 TNF- α ，未加 TNF- α 的样本作为本底，计算回收率。



样本类型	平均回收率 (%)	范围 (%)
血清	101	81~120
EDTA血浆	97	80~119
柠檬酸钠血浆	104	82~118
细胞上清	98	85~116

线性

在4份健康人的血清、血浆中加入高浓度的人TNF- α ，进行线性稀释，以此检测线性回收率。

稀释比例	回收率 (%)	血清	EDTA血浆	柠檬酸钠血浆
1:2	平均值 (%)	94	93	97
	范围 (%)	83~107	86~101	93~117
1:4	平均值 (%)	104	98	101
	范围 (%)	90~115	94~103	87~114
1:8	平均值 (%)	106	104	91
	范围 (%)	93~112	94~111	83~110
1:16	平均值 (%)	92	89	86
	范围 (%)	85~110	81~116	80~108

校准

本试剂盒的标准品为TransGen Biotech校准过的高纯度的重组人TNF- α 。

灵敏度

人TNF- α 的最低可检测浓度为3.0 pg/ml。灵敏度是根据20个重复的零标准品OD值的平均值加两倍标准差计算得到的相对应浓度。

样本值

使用本试剂盒检测了30份健康人血清样本中TNF- α 的水平，30份样本的检测值均低于7.81 pg/ml。

特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人TNF- α 。利用重组人的EGF、FGF-basic、GM-CSF、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-12 p70、IL-12B、IL-23等细胞因子进行特异性的评估，没有观察到交叉反应和干扰影响。



注意事项

1. 本试剂盒应2~8℃避光保存，开封后1个月内用完。
2. 为保证结果准确，每次检测均需做标准曲线。
3. 实验中所用试剂均需充分混匀。
4. 每次洗板完成后，均需在吸水纸上拍干，若板孔内有气泡，可用吸头戳破，注意每个孔只能用一个吸头，避免交叉污染。
5. TMB显色底物为无色透明液体，如有变色请勿使用。
6. TMB显色后可根据显色的深浅来判断是否需要提前或延后加入终止液。
7. 加完终止液后，请在30分钟内完成读数。
8. 推荐使用主波长450 nm，参考波长620 nm的波长下进行读数，若只使用单波长450 nm读数，OD值可能整体偏高，空白值也会相应增高，导致试剂盒的准确度降低。
9. 试剂盒中的终止液具有腐蚀性，操作人员在使用时需戴上手套并注意防护，如果不慎接触，请用大量清水冲洗并及时就医。
10. 为避免交叉污染，加样时请注意每个样品和标准品必须更换枪头。请在实验中使用一次性试管、枪头、封板膜及洁净塑料容器。
11. 不同批号或不同来源的试剂盒组分不可混用。

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V1.0-202207

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

