



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 400-666-5481 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: 3008007435@qq.com

人肿 α 瘤坏死因子酶联免疫吸附测定试剂盒

货号: R90056-96T

储存条件:

本产品需冰袋运输。保存于4℃,保质期6个月;保存于-20℃,保质期12个月。

产品参数:

规格	96次
检测范围	15.62 pg/mL~1,000 pg/mL
敏感性	6 pg/mL
特异性	系统和其它因子无交叉反应
样本类型	人血清、血浆、体液、组织匀浆或细胞培养上清

产品简介:

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法检测样品中人 TNF- α 的浓度。人 TNF- α 捕获抗体已经预包被于酶标板上,当加入样品或标准品时,其中的人 TNF- α 会与捕获抗体结合,而其它游离成分则会通过洗涤被除去。接着,再加入生物素标记的人 TNF- α 抗体后,抗人 TNF- α 抗体与人 TNF- α 接合,形成夹心的免疫复合物,其它游离成分则通过洗涤被除去。随后加入酶复合物,生物素与酶复合物特异性结合,这样酶复合物上的 HRP 就与夹心的免疫复合物连接起来,而其它游离成分则通过洗涤被除去。最后加入显色剂,若样品中存在人 TNF- α ,则会形成免疫复合物,其上连接的 HRP 会催化无色的显色剂氧化生成蓝色物质,而后加入终止液,最终产物呈黄色。通过酶标仪检测,读取 450 nm 处的 OD 值,人 TNF- α 浓度与 OD450 值之间呈正比,通过检测标准品绘制标准曲线,对照未知样品中 OD 值,即可计算出样品中人 TNF- α 的浓度。

背景简介:

肿瘤坏死因子(TNF- α)是由单核细胞和巨噬细胞产生的多肽类细胞因子,在炎症反应、免疫系统的发展、细胞程序性死亡和脂代谢中发挥着重要的作用。在免



疫反应中, TNF- α 通常扮演着一个多功能的调节器角色, 甚至可以作为一个强烈的热原性物质刺激中性粒细胞, 改变血管内皮细胞的特性, 调节其它组织的代谢活性。TNF- α 也可通过抑制脂蛋白脂肪酶的活性而导致恶液病, 爱泼斯坦病毒引起的细胞活化也可被TNF- α 所抑制。

巨噬细胞表面的淋巴因子和肉毒素可介导上皮细胞、内皮细胞和肿瘤细胞等产生TNF- α , 据报道干扰素也能显著提高TNF- α 的分泌量。TNF- α 在关节炎和其它组织炎症的发病机理中发挥着重要的作用, 此外它还参与了包括哮喘、克罗恩氏病、类风湿性关节炎、神经性疼痛、肥胖症、II型糖尿病、自身免疫病和肿瘤等疾病的发生。

产品内容:

组分	体积或数量
人TNF- α 预包被板	8孔条 $\times$ 12个
样品稀释液	30 mL
重组人TNF- α 标准品(冻干)	2支(10 ng/支)
生物素标记人TNF- α 抗体	130 μ L(效价1:100)
抗体稀释液	12 mL
酶复合物(HRP标记的链霉亲和素)	130 μ L(效价1:100)
酶复合物稀释液	12 mL
浓缩洗涤液(25 $\times$)	30 mL
显色剂TMB	10 mL
终止液	10 mL
封板胶纸	4张

操作步骤:

样品制备

1. 根据样品种类选择相应的处理方法:

A. 细胞上清: 将细胞培养上清液100~500 $\times$ g离心5 min, 去除悬浮物后即可;



B. 血清样品: 将全血在室温下静置0.5~2 h, 待其自然凝固并析出血清后, 离心取黄色上清即可 (4°C , $1,000\sim 2,000\times g$, 10 min), 注意请勿吸取沉淀, 制备好的血清需置于冰上待用, 请勿在其中添加任何防腐剂或抗凝剂;

C. 血浆样品: 使用EDTA对全血进行抗凝处理后, 混合均匀置于冰上, 离心取黄色上清即可(4°C , $1,000\sim 2,000\times g$, 10 min), 注意请勿吸取沉淀, 制备好的血浆需置于冰上待用;

D. 组织匀浆/体液: 离心去除沉淀即可。

注意: ① 若待测样品无法及时检测, 样品制备完成后, 请分装冻存于 -20°C , 避免反复冻融;

② 请保证待测样品清澈透明, 检测前如发现样品中有悬浮物, 需通过离心去除;

③ 为了保证检测结果准确, 请勿使用溶血、黄疸、高血脂或污染的样品。

2. 稀释样品

查阅相关文献, 预估样品中待测因子的含量, 从而确定适当的稀释倍数, 使稀释后样品中待测因子的浓度处于 ELISA 试剂盒的最佳检测范围。根据待测因子含量的不同, 分别采取不同的稀释方案:

① 待测因子含量在 $10\sim 100\text{ ng/mL}$ 范围内, 一般按 1:100 稀释, 即向 $297\text{ }\mu\text{L}$ 样品稀释液中加入 $3\text{ }\mu\text{L}$ 样品;

② 待测因子含量在 $1\sim 10\text{ ng/mL}$ 范围内, 一般按 1:10 稀释, 即向 $225\text{ }\mu\text{L}$ 样品稀释液中加入 $25\text{ }\mu\text{L}$ 样品;

③ 待测因子含量在 $15.62\sim 1,000\text{ pg/mL}$ 范围内, 一般按 1:2 稀释, 即向 $100\text{ }\mu\text{L}$ 样品稀释液中加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 样品;

④ 待测因子含量 $\leq 15.62\text{ pg/mL}$, 样品一般无需稀释。

以上方案仅供参考, 实验中请详细记录样品的稀释方法。

检测准备工作

3. 试剂盒自 4°C 冰箱取出后, 请置于室温平衡 20 min; 如从 -20°C 取出, 各组



分需彻底融化后再平衡20 min; 检测完成后, 剩余试剂请及时置于4℃或 -20℃保存;

4. 将浓缩洗涤液(25×)用双蒸水或去离子水稀释成1×洗涤液;

5. 重组人TNF- α 标准品的稀释和使用(在使用前2 h内准备, 室温操作, 请严格控制在25~28℃)

① 配制 10 ng/mL 标准品: 取 1 mL 样品稀释液加入标准品管内, 盖好后静置 15 min 以上, 然后反复颠倒 / 搓动以助溶解;

② 配制 1,000 pg/mL 标准品: 取 100 μ L 10 ng/mL 的标准品加入有 900 μ L 样品稀释液的 EP 管中, 混匀, 做上标记;

③ 按下表将 1,000 pg/mL 标准品用样品稀释液进行倍比梯度稀释。(最高浓度为 1,000 pg/mL, 将标准品稀释液作为浓度 0 pg/mL。)

管号	稀释液用量(μ L)	复溶后标准品用量(μ L)	标准品的最终浓度(pg/mL)
A	0	1,000	1,000
B	300	300(从A管中取)	500
C	300	300(从B管中取)	250
D	300	300(从C管中取)	125
E	300	300(从D管中取)	62.5
F	300	300(从E管中取)	31.25
G	300	300(从F管中取)	15.62
H	300	0	0

注意: 标准品复溶加样后, 剩余部分请丢弃。

6. 准备生物素标记人 TNF- α 抗体工作液

① 按每孔需添加 100 μ L 抗体工作液, 计算其总用量 (为弥补操作中的损耗, 需多配制 100~200 μ L);

② 按 1 μ L 生物素标记人 TNF- α 抗体 添加 99 μ L 抗体稀释液 的比例配制工作液, 轻轻混匀。

7. 准备酶复合物工作液 (需在使用前 1 h 内准备)

① 按每孔需添加 100 μ L 酶复合物工作液, 计算其总用量 (为弥补操作中的损耗, 需多配制100~200 μ L) ;



② 按 1 μL 酶复合物 添加 99 μL 酶复合物稀释液 的比例配制工作液, 轻轻混匀。

检测流程

8. 通过计算确定一次实验所需的板条数, 取出所需板条放置于框架内, 多余的板条请放回铝箔袋密封, 保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 或 -20 $^{\circ}\text{C}$;

注意: ① 标准品和样品建议做双复孔检测;

② 每次实验均需绘制标准曲线。

9. 将用样品稀释液稀释后的样品和不同浓度标准品 (100 μL /孔) 分别加入相应孔中, 用封板胶纸封住反应孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 90 min;

注意: ① 请查阅相关文献确定样品中待检测蛋白的大致浓度, 若其大于本试剂盒标准曲线的最大标准品浓度, 请将样品适当稀释后再进行检测;

② 整个加样过程不宜超过 10 min, 否则可能会影响检测结果。

10. 甩去酶标板内液体, 无需洗板, 将板倒扣在吸水纸上拍干;

11. 加入稀释后的生物素标记人 TNF- α 抗体工作液 (100 μL /孔), 用封板胶纸封住反应孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min;

12. 洗板 5 次, 每孔 1 $\times$ 洗涤液用量为 300 μL , 注入与吸出间隔 15~30 s, 洗完后将板倒扣在吸水纸上拍干;

注意: 洗涤过程至关重要, 洗涤不充分会导致结果产生较大误差。

13. 加入稀释后的酶复合物 (100 μL /孔), 用封板胶纸封住反应孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min;

14. 洗板 5 次, 方法同步骤 12;

15. 加入显色剂 TMB (100 μL /孔), 用封板胶纸封住反应孔, 避光 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10~25 min;

注意: ① 在保存和使用时, 请勿将 TMB 接触氧化剂和金属;

② 因实验室条件差异, 最佳显色时间会有所不同, 反应充分时肉眼可见标准品的前 3~4 孔有明显的梯度蓝色。



16. 加入终止液 (100 μ L/孔), 混匀后即刻使用酶标仪测量 OD450, 同时设定 540 nm 或 570 nm 作为校正波长, 即可计算得到校正吸光度值 (OD450-OD540 或 OD450-OD570);

注意: 读取 OD 值建议在 10 min 内完成。

数据分析

17. 绘制标准曲线。以标准品浓度作横坐标, OD 值作纵坐标, 利用计算机软件作四参数逻辑 (4-PL) 曲线拟合创建标准曲线, 通过样品的 OD 值即可在标准曲线上计算出其相应浓度。

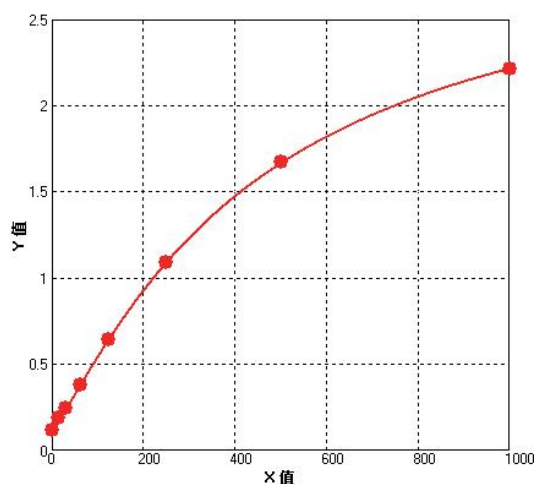
注意: ① 复孔 OD 值在 20% 的差异范围内结果才有效, 复孔 OD 值取平均后可作为测量值;

② 若样品 OD 值高于标准曲线上限, 应适当稀释后重测, 计算浓度时应乘以稀释倍数。

标准曲线范例

人TNF- α 参考标准曲线

标准品浓度	O.D.
0 pg/mL	0.116
15.62 pg/mL	0.188
31.25 pg/mL	0.248
62.5 pg/mL	0.381
125 pg/mL	0.645
250 pg/mL	1.092
500 pg/mL	1.672
1,000 pg/mL	2.213



注意: 本图仅供参考, 应以同次试验标准品所绘标准曲线计算样品含量。

注意事项:



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 400-666-5481 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: 3008007435@qq.com

1. 浓缩洗涤液 低温情况下可能会出现结晶, 请水浴加热使结晶完全溶解后再配制工作液;
2. 严禁混用不同批号试剂盒的组分;
3. 加样过程请避免产生气泡, 实验操作过程中一定要保证试剂充分混匀, 否则会使结果产生较大误差;
4. 说明书中提到的室温条件, 请严格控制在25~28℃;
5. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作;
6. 本产品仅限科研使用。



源叶