

本试剂盒仅供研究使用, 不可用于诊断!

Research use only, not for diagnostic use !

人TNF- α ELISA检测试剂盒使用手册

TNF- α (Human) ELISA Kit User Manual

Catalog No.	RGH810-2
储存/Store at	2~8°C, 避光, 标准品于-20°C保存
灵敏度/Sensitivity	1.95 pg/mL
测定范围/Range	7.8~500 pg/mL



注意! 使用前请阅读安全数据表 (SDS) 并按照指示, 穿戴实验服、防护眼镜和手套操作!

目录

产品描述.....	2
TNF- α 介绍.....	2
试剂盒原理.....	3
试剂.....	4
试剂盒贮存.....	4
试剂配制.....	5
标准品复溶与保存.....	6
冻干人TNF- α 标准品工作液制备.....	7
试剂盒操作流程 (非人血液样本)	8
试剂盒操作流程 (人血液样本)	9
数据处理与分析.....	10
试剂盒性能.....	11
注意事项.....	13
常见问题与解决方案.....	14

产品描述

本产品为人TNF- α 酶联免疫吸附定量检测试剂盒。

TNF- α 介绍

肿瘤坏死因子 α (TNF- α)，也称为恶病质素和TNFSF1A，是TNF超家族的原型配体。它是一种多效分子，在炎症、免疫系统发育、细胞凋亡和脂质代谢中发挥着重要的作用。TNF- α 还与多种疾病的发生相关，包括哮喘、克罗恩病、类风湿性关节炎、神经病理性疼痛、肥胖、2型糖尿病、感染性休克、自身免疫和癌症等。

人TNF- α 是一种26 kDa的II型跨膜蛋白，由35个氨基酸的胞内结构域、21个氨基酸的跨膜区和177个氨基酸的胞外结构域组成。人与恒河猴的胞外结构域具有97%序列同源性，与牛、犬、棉鼠、马、猫、小鼠、猪和大鼠具有71%~92%的同源。它是由多种免疫细胞、上皮细胞、内皮细胞和肿瘤细胞合成。TNF- α 在细胞内组装，形成非共价连接的同源大分子，在细胞表面表达。细胞表面TNF- α 可以诱导肿瘤细胞和病毒感染细胞的裂解，与TNF-RI结合后产生其自身的下游信号。TACE/ADAM17引起膜上TNF- α 胞外区的脱落，形成了具有活性的55 kDa可溶性三聚体。

通常TNF- α 的受体为两种，一种为55~60 kDa TNF-RI，另一种是78~80 kDa TNF-RII，这两种受体均是同源

三聚体。I型和II型受体以差不多的亲和力结合TNF- α ，并能促进NF- κ B活化。

然而，只有TNF-RI包含一个细胞质死亡结构域，该结构域能激活细胞凋亡。这两种受体的可溶性形式都释放到人血清和尿液中，可以中和TNF- α 的生物活性。

试剂盒原理

本试剂盒采用夹心法酶联免疫分析技术。

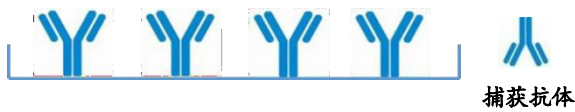


图1. 预包被TNF- α 抗体微孔板

酶标板上预包被了抗人TNF- α 特异性抗体。



图2. TNF- α 被抗体捕获

样品或标准品中的人TNF- α 与包被在微孔中的抗体结合。

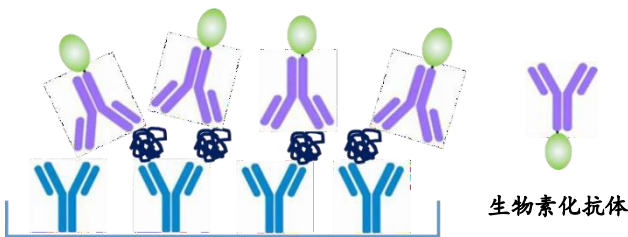


图3. 加入生物素化抗人TNF- α 检测抗体

加入生物素偶联的抗人TNF- α 抗体, 该抗体与第一抗体捕获的人TNF- α 结合。

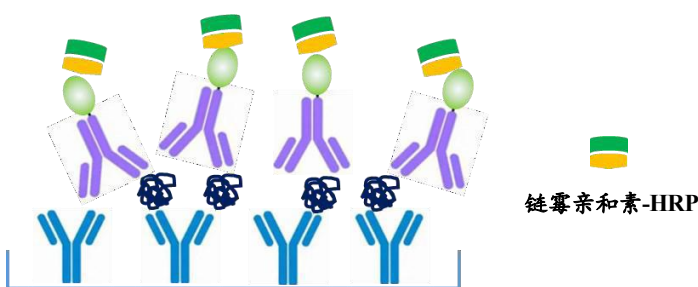


图4. 加入链霉亲和素-HRP

孵育后, 洗去未结合的生物素偶联的抗人TNF- α 抗体。加入链霉亲和素-HRP。

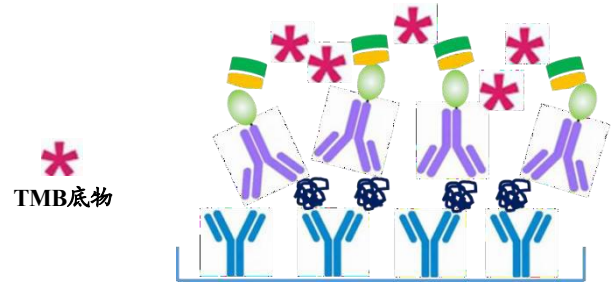


图5. 加入TMB底物缓冲液

加入底物, 经过HRP催化形成蓝色产物, 产物吸光值与样品或标准品中存在的人TNF- α 的量成比例。通过加入酸终止反应, 并在450 nm处测量吸光值。

试剂

人TNF- α ELISA试剂盒(96次检测)

预包被抗人TNF- α 单克隆抗体的微孔板	96次	1块
50 \times 生物素偶联抗人TNF- α 检测抗体	240 μ l	1管
50 \times 链霉亲和素-HRP	240 μ l	1管
冻干人TNF- α 标准品		2管
1 \times 标准品稀释液(人血样本分析用)	8ml	1瓶
1 \times 样本稀释液	24ml	1瓶
1 \times 生物素偶联检测抗体稀释液	12ml	1瓶
1 \times 链霉亲和素-HRP稀释液	12ml	1瓶
20 \times 清洗缓冲液	50ml	1瓶
1 \times TMB底物	12ml	1瓶
1 \times 终止液	12ml	1瓶
封板膜		6张

- 对于血液样本, 应当尽快将血清或血浆分离。样品中出现沉淀时, 需先将沉淀分离后再行分析。避免使用严重溶血或血脂异常的样本。
- 大量的样本应先分装后, 置于-20 $^{\circ}$ C下冷冻保存, 以避免人TNF- α 的活性损失。如果样品在24小时内分析, 可先储存在2~8 $^{\circ}$ C。样品应避免反复冻融。冷冻样品分析前, 应缓慢升至室温, 并轻轻混合。禁止在37 $^{\circ}$ C的水浴中解冻样品。请勿涡旋或剧烈搅动样品。

试剂盒贮存

- 将试剂盒试剂储存在2至8 $^{\circ}$ C之间, 如长期存放(>3个月)需将冻干质控品储存在-20 $^{\circ}$ C以下。
- 使用后, 剩余试剂应立即放回冰箱。
- 请在标签上注明的试剂盒和试剂的有效期内使用。试剂盒只有在正确储存条件下, 才能保证试剂盒成分的有效期。
- 重复使用时避免试剂之间交叉污染。试剂间的污染会造成试剂盒失效。

适用样本与样本处理

- 该试剂盒适用于细胞培养上清、血清、血浆等样本的分析。分析其他生物样品时需对分析方法进行优化。

试剂配制

- 浓缩缓冲液稀释前需恢复至室温。
- 如果浓缩缓冲液中有结晶, 可以预热至结晶溶解后再稀释, 结晶不影响试剂盒性能。

需准备的材料

- 刻度移液管 (5毫升和10毫升)
- 5 μL 至1000 μL 可调单通道微量移液器
- 50 μL 至300 μL 可调多通道微量移液器
- 一次性吸头
- 一次性样品槽
- 配制试剂所需的烧杯、烧瓶、量筒等
- 自动洗板机
- 多波长酶标仪 (450 nm, 620 nm作为可选参考波长)
- 超纯水
- 带有回归分析程序的统计计算机

1 \times 清洗缓冲液:

- 将20 \times 浓缩清洗缓冲液全部倒入干净的容器中。用蒸馏水或纯化水定容至1000 mL。也可以根据使用量, 配制所需体积的清洗缓冲液。
- 轻轻搅拌以避免产生泡沫。
- 清洗缓冲液需储存在2~25 $^{\circ}\text{C}$ 。



清洗缓冲液配制后在3天内使用, 过期可能会影响实验结果!

1 \times 生物素偶联抗人TNF- α 检测抗体:

- 用1 \times 生物素偶联检测抗体稀释液以1:50的比例稀释浓缩的生物素偶联抗人TNF- α 检测抗体。



检测抗体稀释后需在30 min内使用, 请勿使用过期产品!

1 \times 链霉亲和素-HRP:

- 用1 \times 链霉亲和素-HRP稀释液以1:50的比例稀释浓缩的链霉亲和素-HRP。



链霉亲和素-HRP稀释后需在30 min内使用, 请勿使用过期产品!

标准品复溶与保存

冻干标准品复溶

根据标准品标签上标识的质量, 选择适当稀释液进行复溶。并轻轻摇匀, 切记不要剧烈搅拌。复溶后的标准品在常温下静置至少 15 min 后再稀释使用。

冻干标准品保存

冻干标准品在 2~8°C 条件下保存不超过 3 个月。-20°C 及以下低温保存不超过 1 年。

标准溶液使用

标准品复溶后, 一次性使用, 切勿重复再用。

人 TNF- α 标准品复溶小贴士:

1. 取一支 TNF- α 标准品冻干粉 (0.5 ng)。
2. 血清/血浆样本, 建议使用 500 μ L 1 \times 标准品稀释液 (人血样本分析用) 复溶标准品; 非血液样本, 建议使用 500 μ L 1 \times 样本稀释液重溶标准品。此时浓度为 1000 pg/mL。
3. 颠倒混匀, 2000 \times g 离心 10 秒, 让液体处于管底。
4. 静置孵育 15 分钟以确保标准品重组完全。
5. 取 250 μ L 重组好的标准品与 250 μ L 1 \times 稀释液 (与步骤 2 使用同种稀释液) 等比混合均匀即为 S1 (500 pg/mL), 再按照说明书要求依次进行 S2-S7 标准品的 2 倍梯度稀释。

冻干人TNF- α 标准品工作液制备

- 标准蛋白的复溶参照“标准品复溶与保存”操作。
- 复溶后的标准品分装、储存与使用参照“标准品复溶与保存”操作。
- 在微孔板或其他干净的样品管中稀释, 稀释液与复溶标准品稀释液保持一致。
- 对非人血液样品进行分析时, 将复溶后的标准蛋白用1×样品稀释液做后续梯度稀释。
- 对人血液样品进行分析时, 将复溶后的标准蛋白用1×标准品稀释液(人血液样本分析用)做后续梯度稀释。
- 标准品稀释方法:
 - 1) 取7个干净样品管, 分别标记为: S1、S2、S3、S4、S5、S6、S7。
 - 2) 在样品管S2~S7中分别加入225 μ L 相应稀释液。
 - 3) 在S1管中加入450 μ L复溶后的标准蛋白(浓度=500 μ g/mL)。
 - 4) 从S1管中取225 μ L样品移至S2管中, 混合均匀。
 - 5) 重复上述操作, 连续稀释至S7管。
 - 6) 以此创建标准曲线(见图6)。
 - 7) 对非血液样本进行分析时, 以1×样本稀释液或培养基作为空白对照。对血液样本进行分析时, 以1×标准品稀释液(人血液样本分析用)作为空白对照。

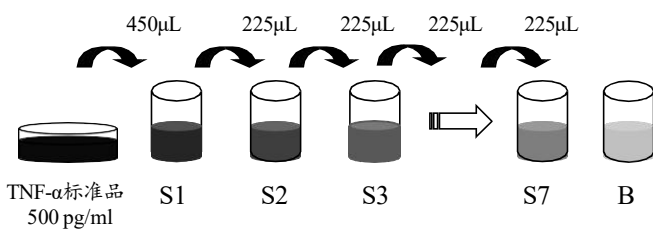


图6. TNF- α 标准品稀释图

试剂盒操作流程 (非人血液样本)

- 根据待测样品的数量、标准曲线和空白对照等确定测试所需孔条的数量。为确保数据可信度, 每个待测点至少需要两个重复孔。从孔条支架上取下额外的微孔条, 并将其装回铝箔袋中, 重新放置 2~8°C 下储存。
- 用大约 300 μL 的清洗缓冲液洗涤微孔条每个孔至少 2 次, 每次洗涤完, 彻底吸出微孔中残留物。保持清洗缓冲液在孔中停留约 10~15 秒。不要刮伤微孔的表面。完成最后一个清洗步骤后, 吸干孔内残留, 并在吸水垫或纸巾上轻敲微孔条以去除多余的清洗缓冲液。清洗后立即使用微孔板条, 或者将微孔条倒置在湿吸水纸上不超过 15 分钟, 以免微孔干燥。

表1. 样品、标准品加样示例

	1	2	3	4
A	标准品A1 500pg/ml	标准品A2 500pg/ml	样品A	样品A
B	标准品B1 250pg/ml	标准品B2 250pg/ml	样品B	样品B
C	标准品C1 125pg/ml	标准品C2 125pg/ml	样品C	样品C
D	标准品D1 62.5pg/ml	标准品D2 62.5pg/ml	样品D	样品D
E	标准品E1 31.3pg/ml	标准品E2 31.3pg/ml	样品E	样品E
F	标准品F1 15.6pg/ml	标准品F2 15.6pg/ml	样品F	样品F
G	标准品G1 7.8pg/ml	标准品G2 7.8pg/ml	样品G	样品G
H	空白	空白	样品H	样品H

- 按照表1, 依次加入 100 μL 不同浓度梯度的标准品。在空白孔中, 加入 100 μL 1 \times 样本稀释液。
- 在待测样品孔中加入 50 μL 1 \times 样本稀释液。
- 将 50 μL 待测样品加到样品孔中, 用封板膜覆盖后, 在室温(18~25°C)下, 500 rpm 震荡孵育 2 小时。

- 去除液体, 用大约 300 μL 的清洗缓冲液洗涤微孔 3 次。
- 向所有孔中加入 100 μL 1 \times 生物素化检测抗体。
- 用封板膜覆盖后, 在室温(18~25°C)下, 500 rpm 震荡孵育 1 小时。
- 去除液体, 用大约 300 μL 的清洗缓冲液洗涤微孔 3 次。
- 向所有孔中添加 100 μL 1 \times 链霉亲和素-HRP。
- 用封板膜覆盖后, 在室温(18~25°C)下, 震荡孵育 0.5 小时。
- 去除液体, 用大约 300 μL 的清洗缓冲液洗涤微孔, 每个孔不少于 6 次, 每次加入新清洗缓冲液时, 保持浸润 15~30 秒。
- 向所有孔中添加 100 μL TMB 底物溶液。在室温(18~25°C)下避光孵育 10~20 分钟。当最高浓度标准样品已显深蓝色时, 立即终止显色 (以免显色过度)。如果显色不够, 可以适当增加显色时间。也可通过测定最高浓度标准样品在 620 nm 下的吸光值, 当达到 0.9~0.95 时, 立即终止反应。
- 向每个孔中迅速加入 100 μL 终止液。并尽快读取显色结果。如无法尽快读数, 需将微孔板条避光、2~8°C 放置, 且必须在一小时内完成读数。
- 选择主波长 450 nm (任选 610~650 nm 作为参考波长), 测定每个微孔的吸光值。



孵育过程中未震荡可能造成吸光值偏低, 但不影响测定效果!

试剂盒操作流程 (人血液样本)

- 根据待测样品的数量、标准曲线和空白对照等确定测试所需孔条的数量。为确保数据可信度, 每个待测点至少需要两个重复孔。从孔条支架上取下额外的微孔条, 并将其装回铝箔袋中, 重新放置2~8°C下储存。
- 用大约300 μL 的清洗缓冲液洗涤微孔条每个孔至少2次, 每次洗涤完, 彻底吸出微孔中残留物。保持清洗缓冲液在孔中停留约10~15秒。不要刮伤微孔的表面。完成最后一个清洗步骤后, 吸干孔内残留, 并在吸水垫或纸巾上轻敲微孔条以去除多余的清洗缓冲液。清洗后立即使用微孔板条, 或者将微孔条倒置在湿吸水纸上不超过15分钟, 以免微孔干燥。
- 按照表1, 依次加入100 μL 不同浓度梯度的标准品。在空白孔中, 加入100 μL 、1 \times 标准品稀释液(人血液样本分析用)。
- 血液样本的分析至少需要稀释2倍以上, 建议使用时需将样本进行预实验, 确定最佳稀释倍数。
- 在待测样品孔中加入100 μL 用1 \times 样品稀释液稀释后的样本。在室温(18~25°C)下500 rpm震荡孵育2小时。
- 去除液体, 用大约300 μL 的清洗缓冲液洗涤微孔3次。
- 向所有孔中加入100 μL 1 \times 生物素化检测抗体。
- 用封板膜覆盖后, 在室温(18~25°C)下, 500 rpm震荡孵育1小时。
- 去除液体, 用大约300 μL 的清洗缓冲液洗涤微孔3次。
- 向所有孔中添加100 μL 1 \times 链霉亲和素-HRP。

- 用封板膜覆盖后, 在室温(18~25°C)下, 500 rpm震荡孵育0.5小时。
- 去除液体, 用大约300 μL 的清洗缓冲液洗涤微孔, 每个孔不少于6次, 每次加入新清洗缓冲液时, 保持浸润15~30秒。
- 向所有孔中添加100 μL TMB底物溶液。在室温(18~25°C)下避光孵育10~20分钟。当最高浓度标准样品已显深蓝色时, 立即终止显色(以免显色过度)。如果显色不够, 可以适当增加显色时间。也可通过测定最高浓度标准样品在620 nm下的吸光值, 当达到0.9~0.95时, 立即终止反应。
- 向每个孔中迅速加入100 μL 终止液。并尽快读取显色结果。如无法尽快读数, 需将微孔板条避光、2~8°C放置, 且必须在一小时内完成读数。
- 选择主波长450 nm(任选610~650 nm作为参考波长), 测定每个微孔的吸光值。



孵育过程中未震荡可能造成吸光值偏低, 但不影响测定效果!

数据处理与分析

- 计算每组标准品和样品的平均吸光值, 偏差应 $\leq 20\%$ 。以人TNF- α 浓度为横坐标、标准品的平均吸光值为纵坐标, 绘制标准曲线。建议使用4或5参数曲线拟合方法绘制最佳拟合曲线。
- 通过样品的平均吸光值, 确定待测样品中TNF- α 的浓度。
- 实验中, 注意样品乘以稀释倍数后进行分析。
- 当计算的浓度超过线性范围内的最大值时, 样本需要进一步稀释, 以便精确定量。
- 典型的标准曲线如图7所示。因操作条件的不同, 每次进行实验时, 应当重新绘制标准曲线。确保结果准确。
- 标准曲线的吸光值可能因分析条件差别而异(例如, 操作员、移液偏差、清洗效果或温度等条件影响)。此外, 试剂盒的保存期可能影响酶活性, 从而影响显色效果。显色效果差异一般不影响实验结果。

限制因素

- 由于样品分析因检测条件而异, 因此每次运行都必须建立新标准曲线。
- 样本或试剂因生物污染或试剂之间的交叉污染可能会导致错误的结果。
- 尽量采用干净一次性移液器吸头、容器等, 对于可重复使用的玻璃器皿, 必须在清洁后使用, 并彻底冲洗掉所有清洁剂。
- 不适当或不充分的清洗将导致假阳性或假阴性结果。
- 在任何新的清洗流程之前需完全吸干残余的溶液, 按照每个步骤

要求进行清洗, 不要让孔长时间敞开或干燥。

图7. 典型人TNF- α ELISA的标准曲线

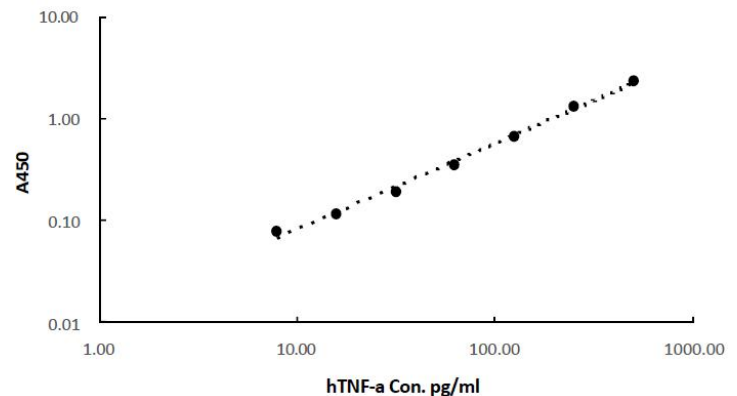


表2. 典型人TNF- α ELISA OD450吸光值

测量波长: 450nm
参考波长: 620nm

Con. pg/ml	A450			CV (%)
500.00	2.36	2.40	2.43	3.83%
250.00	1.32	1.37	1.38	3.25%
125.00	0.71	0.71	0.75	2.52%
62.50	0.40	0.40	0.41	0.74%
31.25	0.23	0.23	0.24	0.49%
15.63	0.15	0.16	0.16	0.57%
7.81	0.12	0.13	0.12	0.58%
Blank	0.05	0.05	0.04	0.51%

试剂盒性能

灵敏度

本试剂盒对人TNF- α 的灵敏度为**1.95 pg/mL**。

重现性

• 批内分析

通过已知浓度的3个样品, 同一块板上测定20次评估批内差异, 分析结果(见表3)。总批内变异系数为4.9%。

• 批间分析

通过已知浓度的3个样品, 经过2个以上批次的试剂盒, 且经过3个不同实验员的测定20次评估批间差异, 分析结果(见表3)。总批间变异系数为8.3%。

表3. 试剂盒批内与批间分析

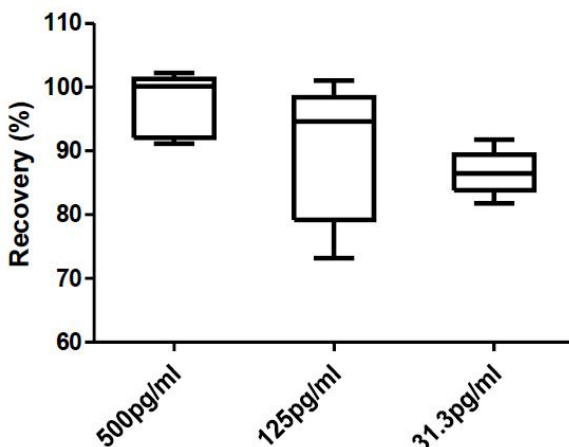
样品编号	批内分析			批间分析		
	No.1	No.2	No.3	No.1	No.2	No.3
测定次数	20	20	20	20	20	20
浓度均值 (pg/ml)	238	118	59.8	232	113	57.4
C.V.(%)	4.80	5.60	4.32	7.20	9.60	8.16

加标回收

• 人血清

通过将3个浓度的人TNF- α 加入到5个人血清样本中评估回收率, 平均回收率为86.6~97.4% (图8)。

图8. hTNF- α 在人血清回收率
Human serum (25%)

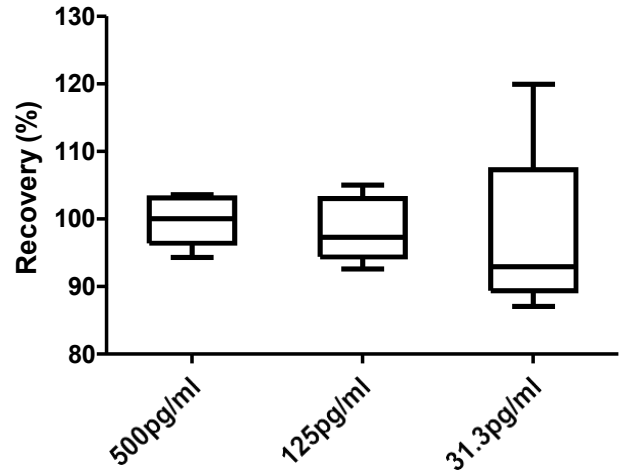


• 人血浆 (EDTA)

通过将3个浓度的人TNF- α 加入到5个EDTA抗凝的人血浆样本中评估回收率, 平均回收率为97.3~99.9% (图9)。

图9. hTNF- α 在EDTA血浆回收率

EDTA Plasma (25%)

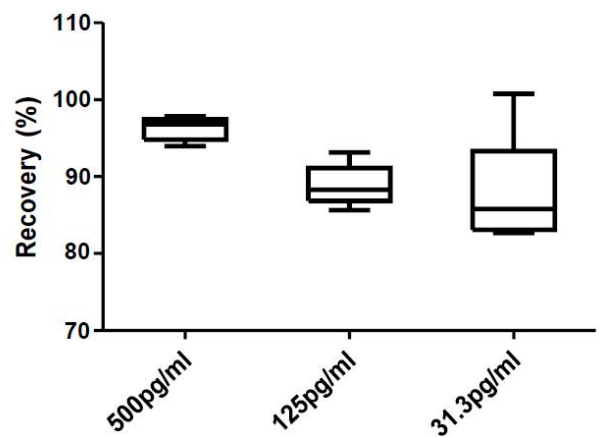


• 人血浆 (柠檬酸)

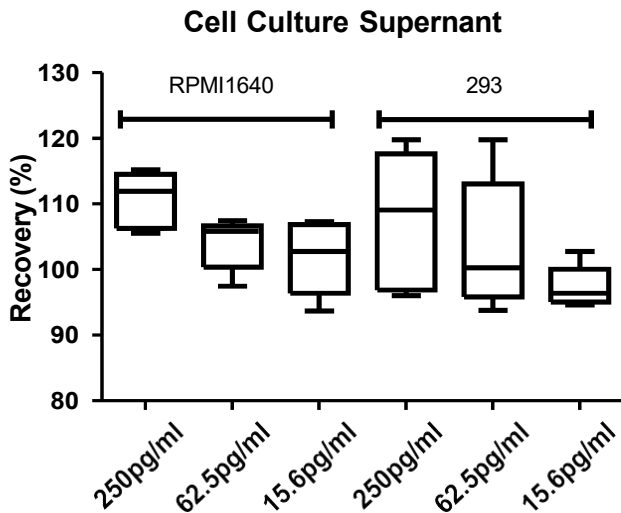
通过将3个浓度的人TNF- α 加入到5个柠檬酸抗凝的人血浆样本中评估回收率, 平均回收率为87.7~96.3% (图10)。

图10. hTNF- α 在柠檬酸血浆回收率

Cit Plasma (25%)



- 细胞培养上清
 通过将3个浓度的人TNF- α 加入到经过RPMI1640 (含10%FBS)、HEK293 (无血清型) 的细胞培养上清样本中评估回收率, 平均回收率为97.3~110.7% (图11)。

 图11. hTNF- α 在细胞培养上清中回收率

 表4. 人TNF- α 在血液样本中稀释后的线性关系

理论浓度	稀释比例		血清	血浆 (Cit)	血浆 (EDTA)
500 pg/ml	1:2	平均浓度 pg/ml	495.68	501.04	476.11
		回收率范围 %	91~106	94~105	90~98
250 pg/ml	1:4	平均浓度 pg/ml	241.00	241.81	256.72
		回收率范围 %	93~101	93~101	97~110
125 pg/ml	1:8	平均浓度 pg/ml	109.84	123.25	128.89
		回收率范围 %	83~95	95~110	92~105
62.5 pg/ml	1:16	平均浓度 pg/ml	55.42	63.04	59.16
		回收率范围 %	82~95	82~118	83~109

线性

将不同浓度的人TNF- α 标准品, 加入到人血液样品中, 用样品稀释液, 以2倍梯度连续稀释4次。每个实验测定4个样品, 计算稀释后的样品浓度与回收率范围 (表4)。

特异性

通过将正常生理浓度的干扰因子掺入人TNF- α 阳性血清中, 来评估因子的干扰。未检测到交叉反应。

注意事项

- 所有化学品都应被视为具有潜在危险。建议仅由接受过实验室技术培训的人员操作使用本产品, 并按遵循良好实验室规范的原则。使用时需穿戴合适的防护服, 佩戴好安全眼镜和手套。应注意避免试剂接触到皮肤或眼睛。如果接触到, 立即用大量水冲洗。具体建议见材料安全数据表 (SDS) 和/或安全声明。
- 试剂仅供研究使用, 不得用于诊断或治疗。
- 请勿将其他批次或其他来源的试剂混合使用或替换。
- 请勿使用标签上过期的试剂盒试剂。
- 在储存或孵育过程中, 请勿将试剂盒试剂暴露在强光下。
- 取用试剂时, 禁止用嘴吸取移液管。
- 请勿在处理试剂盒试剂或样本的区域进食或吸烟。
- 处理试剂盒试剂或样本时, 应佩戴橡胶或一次性乳胶手套。避免皮肤或粘膜接触试剂盒试剂或样本。
- 避免底物溶液与氧化剂和金属接触。
- 避免飞溅或产生气溶胶。
- 为避免微生物、试剂或样本的交叉污染而导致测试无效, 请使用一次性移液器吸头和/或移液器。
- 使用洁净的专用试剂容器分装结合物和底物试剂。暴露在酸中会使结合物失活。
- 试剂稀释和配制需用蒸馏水或纯水。
- 底物溶液使用前必须恢复至室温。
- 被污染的材料或疑似粘有传染性病原体的样本需进行净化处理后再行丢弃。首选方法是121°C下灭菌至少1小时。
- 不含酸的液体废物和中和废物可用1.0%次氯酸钠处理30分钟后排放。酸性液体废物在添加次氯酸钠之前必须先中和。

常见问题与解决方案

问题	可能原因	解决方案
背景偏高	清洗不当	按照操作规程清洗, 清洗间隙增加浸润时间
	交叉污染	及时更换吸头, 避免交叉污染。清洗后将孔内溶液吸干。
	底物原因	加入底物前, 确保颜色为无色, 出现淡蓝色会造成背景偏高
无信号	生物素化抗体、酶等稀释不当	确保按照操作规程稀释
	酶标板不合适	采用高吸附性酶标板
	错误操作	确保按照操作规程实验
	酶抑制剂	清洗液、酶稀释液中避免出现叠氮钠等酶抑制剂
	清洗不当	按照正确流程清洗
信号偏弱	标准品稀释不当	按照标准品处理流程操作
	孵育时间过短	增加孵育时间
	试剂储存不当	按照试剂盒储存要求保存
	酶标仪波长选择不当	确认酶标仪设定参数
	酶标板选择不合适	选择高吸附性酶标板
平行性差	清洗不当	按照正确流程清洗
	样品混合问题	确保样品有效混匀
	酶标板污染	使用前检查酶标板是否有污染和刮伤
	酶标板选择不合适	选择优质酶标板
	试剂过期	使用前检查试剂是否在有效期内