EK182-BW1

Human TNF-α ELISA Kit
检测试剂盒（酶联免疫吸附法）

Catalog Number

EK182 - 48

EK182 - 96

定量检测血清、血浆和细胞培养上清中的人肿瘤坏死因子 α(TNF-α)浓度。

本产品仅用于科学研究，非诊断试剂，不能用于临床诊断。

一、 产品介绍

1. 背景介绍

肿瘤坏死因子 α(TNF-α) 也称为恶病质素和TNFSF1A，是一种脂肪因子， 参与全身的炎症， 同时也是刺激急性期反 应的细胞因子之一。它主要由活化的巨噬细胞产生， 也可由其它类型的细胞分泌，如 $CD4^+$ 淋巴细胞、NK 细胞、 中性粒 细胞、 肥大细胞、嗜酸性粒细胞和神经元等。它在免疫应答中具有多种调节功能， 还可作为潜在的热原。TNF-α 对刺激 物 (感染因子或组织受损) 产生应答后，在全身循环，激活中性粒细胞，改变血管内皮细胞的特性， 调控其它组织的代 谢活性， 以及通过诱导局部凝血作用展现肿瘤杀伤活性。TNF-α 在关节组织和其它组织发生炎症的发病机制具有重要作 用。 最近，越来越多的信息表明 TNF-α 也参与了 AIDS 的发病机制。TNF-α 的测定对于移植研究也非常有用。

2. 检测原理

本试剂盒采用双抗体夹心酶联免疫吸附检测技术。特异性抗人 TNF-α 抗体预包被在高亲和力的酶标板上。酶标板孔 中加入标准品、待测样本和生物素化的检测抗体，经过孵育，样本中存在的 TNF-α 与固相抗体和检测抗体结合。 洗涤去 除未结合的物质后，加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(Streptavidin-HRP)。洗涤后，加入显色底物 TMB，避光显色。 颜色反应的深浅与样本中 TNF-α 的浓度成正比。加入终止液终止反应，在 450 nm波长(参考波长 570 - 630 nm)测定吸光 度值。

3. 试剂盒检测的局限

1) 请在本试剂盒标示的有效期内使用。
2) 试剂盒的试剂不能与其他批号的试剂或其他来源的试剂混合使用。
3) 任何标准品稀释、操作人员、移液技术、洗涤技术、孵育温度、试剂盒保存时间的改变，都将影响结合反应。
4) 本试剂盒在设计上去除或降低了生物学样本中的一些内源性干扰因素，并非所有可能的影响因素都已经去除。

二、基本信息

1. 试剂盒提供的材料

组分	编号	**EK182 - 48**	**EK182 - 96**
预包被酶标板	EK182P	48T	96T
标准品	EK182S	1 vial	2 vials
检测抗体	EK182D	1 vial	1 vial
标准品稀释液	E0260	5 ml	5 ml
链霉亲和素	E0290	1 vial	1 vial
10×检测缓冲液	E0310	5 ml	5 ml
显色底物	E0230	6 ml	11 ml
终止液	E0300	11 ml	11 ml
20×洗液	E0281	50 ml	50 ml
封板膜	E0200	6	6

2. 未提供的材料设备

1) 能够检测 450 nm 吸光度的酶标仪，参考波长 570 nm 或 630 nm
2) 移液器及枪头、加样槽
3) 准备试剂用的试管、离心管、量筒等
4) 蒸馏水或去离子水
5) 涡旋振荡器、微孔板振荡器

3. 贮存

试剂盒保存于 2 - 8 ℃，有效期标注于标签上。只有恰当保存的试剂才是有保证的。如果试剂盒的组分需要再次使用，请确保上一次使用之后没有被污染。

<table>
<tr><td colspan="2">未开封试剂盒</td><td>贮存于 2 - 8 ℃。
请在有效期内使用。</td></tr>
<tr><td rowspan="3">打开的试剂盒或重组试剂</td><td>1×洗液
1×检测缓冲液
终止液
标准品稀释液
显色底物
检测抗体
链霉亲和素</td><td>在 2 - 8 ℃，
大约可以贮存 1 个月。</td></tr>
<tr><td>标准品</td><td>在-20 ℃，大约可贮存 1 个月。
重溶使用1次后丢弃。</td></tr>
<tr><td>酶标板</td><td>未使用的板条请放回铝箔袋，封好封口。在 2 - 8 ℃，大约可贮存 1 个月。</td></tr>
</table>

4. 注意事项

1) 所有的化学试剂理应被认为具有潜在危害。
2) 推荐只有经过良好实验室培训的工作人员方可操作本试剂盒。操作时请佩戴合适的防护设施，例如白大衣、乳胶手 套、安全眼镜等。
3) 请避免试剂接触皮肤和眼睛。如不慎接触，请立即用大量清水清洗。
4) 试剂盒中的终止液为酸性溶液，在使用终止液时，请佩戴防护服，及防护眼睛、手及面部的设施。
5) 本试剂盒用于科学研究，不能用于诊断治疗。
6) 请不要使用其他批号或其他来源的试剂替代本试剂盒中的试剂。
7) 请不要使用过期的试剂。
8) 在试剂盒的贮存或孵育过程请避免强光照射。
9) 在操作试剂盒或处理样本的区域请不要饮食。
10) 不要让试剂或样本接触皮肤和粘膜。

11) 在操作试剂盒或处理样本时请佩戴乳胶或一次性手套。
12) 显色底物避免与氧化试剂和金属接触。
13) 避免气溶胶的产生。
14) 为了避免微生物的污染，以及试剂与样本间的交叉污染，请使用一次性枪头。
15) 使用干净的容器配制试剂。
16) 暴露于酸性环境会抑制结合。
17) 试剂的准备必须使用蒸馏水或去离子水。
18) 显色底物在使用之前必须平衡至室温（25℃±3℃）。
19) 样本可能含有传染性病原体，处理样本和可能的污染材料的首选方法是 121.5℃，最少 1 小时。
20) 液体废弃物的处理。不含酸的液体废弃物， 加入1.0%的次氯酸钠， 浸泡30 分钟。含酸的液体废弃物，请先中和，再加入次氯酸钠。
21) 有时标准品稀释液中可观察到蛋白沉淀，该沉淀不影响使用，可以忽略。或者可通过 6,000 × g 离心 5 分钟去除沉 淀。

5. 技术要点

1) 重溶或者混合蛋白的时候，始终避免气泡产生。
2) 避免交叉污染，在进行标准品加样、样本加样，以及不同试剂加样的时候，请更换枪头。不同的试剂，使用不同的加样槽。
3) 在应用自动洗板机时， 加入洗液之后，设置30 秒的浸泡程序，或者在不同的洗涤步骤将微孔板掉转180 度，这样可以提高分析的准确度。
4) 为保证结果的精确性，孵育时封好封板膜。
5) 显色底物在添加之前应是无色的。保持显色底物始终处于避光态。
6) 终止液的添加顺序应与显色底物的添加顺序相同。
7) 添加终止液之后，底物的颜色应由蓝色转变为黄色。如果底物呈现绿色，说明终止液与显色底物没有充分混匀。
8) 推荐所有的检测样本和标准品在检测中设复孔。
9) 在任何情况下，避免接触微孔板的内表面。

三、 检测步骤

1. 样本采集与贮存

细胞培养上清

300 × g 离心 10 分钟去除沉淀物， 即刻检测，或者分装， -20℃以下贮存。

血清样本

离心管收集血清。血样凝集 30 分钟后，1,000 × g 离心 10 分钟。吸取血清样本之后即刻检测，或者分装，-20℃以下贮存。

血浆样本

EDTA、枸橼酸钠或肝素抗凝收集血浆样本。1,000 × g 离心 30 分钟收集样本。即刻检测， 或者分装， -20℃以下贮 存。

本试剂盒可能适用于其它生物学样本。细胞培养上清、血清和血浆已经过验证。

注意： 检测前， 样本中可见的沉淀必须去除。不要使用严重溶血或高血脂的样本。样本应分装并贮存于**-20** ℃，以避 免人 **TNF-α** 活性的丢失。如果在 **24** 小时内检测。样本可以存放在 **2 - 8** ℃。

避免样本的反复冻融。在检测前，冷冻样本应缓慢地恢复至室温（25℃±3℃）， 轻柔地混匀。

2. 试剂准备

检测前请将所有的试剂、样本恢复至室温（25℃±3℃）。

如果浓缩的试剂出现结晶，37℃温浴，直至结晶全部溶解。

1×洗液

吸取 20×浓缩洗液 50 ml 至 1 L 的量筒，加蒸馏水至 1,000 ml ，轻轻混匀，避免泡沫。转移至干净瓶内。2 - 8 ℃贮存， 1×洗液可稳定保存 30 天。

1×检测缓冲液

吸取 10×浓缩检测缓冲液 5 ml 至 100 ml 量筒，加蒸馏水至 50 ml，轻轻混匀， 避免泡沫。 2 - 8 ℃贮存，1×检测缓冲 液可稳定保存 30 天。

检测抗体工作液

稀释前充分混匀。根据标准品和待检样本的数量，用**1×**检测缓冲液按**1：100**稀释浓缩的检测抗体。

链霉亲和素工作液

稀释前充分混匀。根据标准品和待检样本的数量，用**1×**检测缓冲液按**1：100**稀释浓缩的链霉亲和素。

注意：检测抗体工作液、链霉亲和素工作液均应在30分钟内使用

样本稀释

为了保证实验成功，由于对样本的处理方式，培养条件等不同，建议首次使用本试剂盒前先进行一次预实验以摸索最佳的样本浓度，避免因过浓使显色反应超出酶标仪的检测上限或稀释倍数过大低于试剂盒灵敏度。对于样本的稀释，请用1×检测缓冲液稀释血清/血浆样本，用细胞培养基稀释细胞培养上清。

标准曲线的制备

开盖前短暂离心，用蒸馏水重溶 标准品， 重溶体积标注于标准品的标签上。轻柔地涡旋震荡，确 保充分混匀，重溶后标准品的浓度为 2,000 pg/ml。重溶后静置 10 - 30 分钟。稀释前充分混匀。

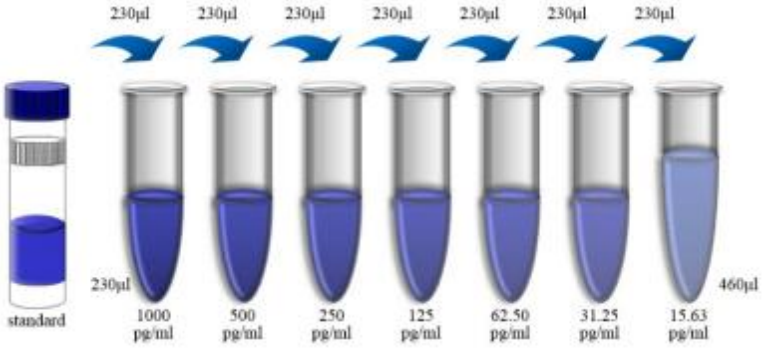
请使用聚丙烯管进行标准品稀释。

血清/血浆样本标准曲线的制备：

取 230μl 浓缩的标准品， 加入 230μl 标准品稀释液，作为标准曲线的最高浓度 (1,000 pg/ml)。在每一个试 管中加入 230 μl 标准品稀释液。使用高浓度标准品做 1 ：1 系列稀释。每次移液时，请确保充分混匀。以标准品稀释液 作为标准曲线的零浓度。

细胞培养上清样本标准曲线的制备：

取 230 μl 浓缩的标准品，加入 230 μl 细胞培养基，作为标准曲线的最高浓度(1,000 pg/ml)。在每一个试管 中加入 230 μl 细胞培养基。使用高浓度标准品做 1 ：1 系列稀释。每次移液时，确保充分混匀。以细胞培养基作为标准 曲线的零浓度。



3. 检测步骤

检测之前请将所有的试剂、样本平衡至室温（25℃±3℃）。

1) 准备好所有需要的试剂及工作浓度标准品。
2) 将不需要的板条拆卸下来，放回装有干燥剂的铝箔袋，重新封好封口。
3) 浸泡酶标板：加入300μl 1×洗液静置浸泡30 秒。为了获得理想的实验结果浸泡是必须的。弃掉洗液之后，在吸水纸上将微孔板拍干。洗板完成之后，请立即使用微孔板，不要让微孔板干燥。
4) 加标准品：标准品孔加入100 μl 2 倍倍比稀释的标准品。空白孔加入100 μl 标准品稀释液(血清/血浆样本)或培养基 (细胞培养上清样本)。
5) 加样本：血清/血浆：样本孔加入 50 μl 1×检测缓冲液和 50 μl 样本。细胞培养上清：样本孔加入 100 μl 细胞培养上清。
6) 加检测抗体：每孔加入50μl “检测抗体工作液”(参见试剂准备)。保证步骤 4 、5 、6 连续加样，不要间断。加样过程在 15 分钟内完成。
7) 孵育：使用封板膜封板。100-300转/分钟振荡（保证每孔溶液不撒出且能充分混匀即可），室温（25℃±3℃）孵育 2 小时。
8) 洗涤：弃掉液体，每孔加入 300 μl 洗液洗板，洗涤 6 次。每次洗板，在吸水纸上拍干。为获得理想的实验性能，必须彻底移除残留液体。
9) 加酶孵育：每孔加入 100 μl “链霉亲和素工作液”(参见试剂准备)。
10) 孵育：使用新的封板膜封板。100-300转/分钟振荡（保证每孔溶液不撒出且能充分混匀即可），室温（25℃±3℃）孵育 45 分钟。
11) 洗涤：重复步骤 8。
12) 加底物显色：每孔加入 100 μl 显色底物，避光，室温（25℃±3℃）孵育 5 - 30 分钟。

13) 加终止液：每孔加入100 μl 终止液。颜色由蓝色变为黄色。如果颜色呈现绿色或者颜色的变化明显不均匀，请轻轻叩击板框，充分混匀。

14) 检测读数：在 30 分钟之内，使用酶标仪进行双波长检测，测定450 nm 最大吸收波长和 570 nm 或 630 nm参考波长下的 OD 值。校准后的 OD 值为 450 nm 的测定值减去 570 nm 或 630 nm 的测定值。仅使用 450 nm 测定会导致 OD 值偏高，并且准确度降低。

如何控制标曲显色？(仅针对双抗夹心法ELISA试剂盒)

5 - 30分钟显色时间为经验范围，每个具体的实验，可根据以下情况，确定大致的显色时间：

1) 肉眼观察：标曲S5孔有淡蓝色、Blank孔无明显蓝色时，即可终止；
2) 仪器判断：630 nm左右波长下，标曲S1孔的OD值达到0.5 - 0.7、S5孔的OD值达到0.05 - 0.08、Blank孔的OD值小于0.05时，即可终止；
3) 高敏系列试剂盒因灵敏度更高，需严格控制显色时长，可较普通试剂盒适当缩短显色时间。

未尽事宜，请拨打联科生物技术支持热线400-6721-600，获得更多帮助。

四、 分析

1. 结果计算

计算标准品和样本的平均 OD 值，然后减去零浓度标准品的OD 值。

以标准品浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，用计算机软件进行回归拟合生成标准曲线。回归分析确定最佳拟合曲线。通过对浓度值和 OD 值取对数拟合，可以对标准曲线进行线性化。 此过程可能可以得到更多样本的浓度，但数据的准确 度会降低一些。

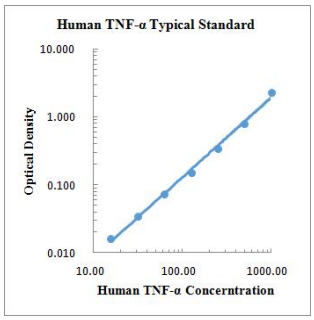
注意：标准曲线最高浓度点的终浓度为 **1,000 pg/ml**。

如果血清/血浆样本按照说明书进行稀释， 最终的稀释倍数为 **2**。如果样本进行了其它方式的稀释， 计算样本浓度时 请乘以相应的稀释倍数。

2. 典型数据

每次检测，每块酶标板都必须设立标准曲线。下面的标准曲线仅作为示例参考。

pg/ml	O.D.		Average	Corrected
0.000	0.028	0.032	0.030	
15.625	0.046	0.046	0.046	0.016
31.250	0.065	0.063	0.064	0.034
62.500	0.102	0.103	0.103	0.073
125.000	0.177	0.187	0.182	0.152
250.000	0.369	0.369	0.369	0.339
500.000	0.837	0.835	0.836	0.806
1000.000	2.382	2.341	2.362	2.332



3. 灵敏度

人 TNF-α 的最低可检测浓度为 5.77pg/ml (6 次独立实验的平均值)。

10 个零标准品浓度 OD 的平均值加上两倍 SD，计算最低可检测浓度。

4. 精密度

酶标板内精密度

3 个已知浓度的样本酶标板内重复测定 20 次， 评估酶标板内的精密度。

酶标板间精密度

3 个已知浓度的样本酶标板间重复检测 6 次，评估酶标板间的精密度。

	酶标板内精密度				酶标板间精密度		
样本	1	2	3		1	2	3
	20	20	20		6	6	6
平均值 **(pg/ml)**	74.5	202.1	571.2		74.1	214.8	560.1
标准差	6.6	9.5	21.7		6.2	13.5	28.0
变异系数 **(%)**	8.9	4.7	3.8		8.4	6.3	5.0

5. 回收率

5 份健康人血清中加入 3 个不同浓度水平的人 TNF-α，未加人 TNF-α 的血清作为本底，计算回收率。回收率的范围 从 89%至 120%，平均回收率为103 %。

6. 稀释线性

5 份健康人血清中加入高浓度的人 TNF-α，并在标准曲线的动力学范围内进行系列稀释，评估检测的线性。

	平均值 **(%)**	范围 **(%)**
1:2	89	78 - 112
1:4	90	80 - 105
1:8	100	91 - 110
1:16	98	93 - 105

7. 校准

本试剂盒的标准品经大肠杆菌表达的高纯度重组人TNF-α (12/154)校准，后者由英国国家生物标准与检定所/世界卫生组织于2013 年 11 月进行校准。校准结果如下：

NIBSC/WHO (12/154) approximate value (U/ml) = 0.043 × MultiSciences Human TNF-α value (pg/ml)。

8. 样本值

应用本试剂盒， 检测 30 份志愿者的血清样本，志愿者的用药史不详。

样本类型	检测样本数量	浓度范围 **(pg/ml)**	可测百分率 **(%)**	可测样本平均浓度 **(pg/ml)**
血清	30	n.d. – 1084.3	44	257.2

n.d. = 测不到浓度值。样本的浓度值低于灵敏度被认为测不到浓度值。

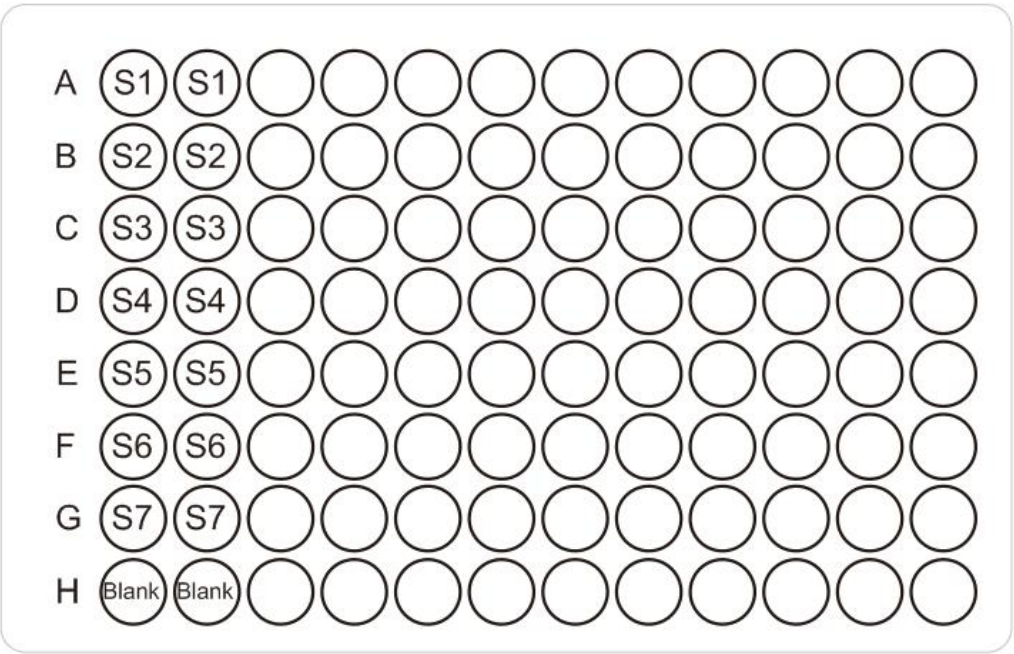
注意**:** 此样本值范围非生理值范围。样本的浓度范围因种属、样本制备以及检测人员、设备的不同而有所不 同。以上数据仅供参考。

9. 特异性

本试剂盒识别天然和重组人 TNF-α 。下述因子进行了特异性的评估， 没有观察到明显的交叉反应和干扰影响。

人		小鼠	大鼠
IFN-γ	IL- 17A	IFN-γ	IFN-γ
IL- 1β	IL- 18	IL- 1β	IL- 1β
IL-2	IL-21	IL-2	IL-2
IL-4	IL-22	IL-4	IL-4
IL-5	IL-23	IL-6	IL-6
IL-6	MCP-1	IL- 10	IL- 10
IL-8	TGF-β1	IL- 17A	IL- 17A
IL- 10	VEGF	TNF-α	TNF-α
IL- 12			

10. 排板布局



更多资讯和支持请关注联科生物公众号