

人肿瘤坏死因子 α (TNF- α) ELISA Kit

Catalog Number: BSKV0017

本试剂盒用于定量检测人血清、血浆或细胞培养上清液等样本中人肿瘤坏死因子 α (TNF- α)含量。**使用前请仔细阅读说明书并检查试剂组分**，如有任何疑问请与北京博奥森生物技术有限公司联系，公司将为您提供强有力的技术支持。

仅供研究，不用于临床诊断。

目录

检测原理.....	3
试剂盒组成.....	3
其它实验材料.....	3
注意事项.....	4
样本收集、处理及保存方法.....	4
试剂准备.....	5
操作步骤.....	5
结果判断.....	6
试剂盒性能.....	7
检测范围.....	7
灵敏度.....	7

检测原理:

本试剂盒采用 ELISA 双抗体夹心法原理。用纯化的肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 抗体包被微孔板，向已包被的微孔板中依次加入标准品及待测样本与辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的 TNF- α 抗体，使固相载体上形成抗体-抗原-酶标抗体复合物，经过彻底洗涤后加入底物 TMB 显色。TMB 在 HRP 酶的催化作用下转化成蓝色，并在酸的作用下最终转化成黄色。颜色的深浅和样本中的 TNF- α 含量呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光值 (OD 值)，通过绘制标准曲线计算样本中 TNF- α 浓度。

试剂盒组成:

试剂盒组成	规格 (96T)	保存条件
抗体包被板条	8×12	2-8℃ 保存
标准品	2 支	2-8℃ 保存
S1 标准品/样本稀释液	25 ml×1 瓶	2-8℃ 保存
浓缩酶结合物 (100×)	60 μ l×2 瓶	2-8℃ 保存
S2 酶结合物稀释液	15ml×1 瓶	2-8℃ 保存
浓缩洗涤液 (20×)	25ml×1 瓶	2-8℃ 保存
显色底物 (避光)	12ml×1 瓶	2-8℃ 保存
终止液	6ml×1 瓶	2-8℃ 保存
封板胶纸	4 张	
说明书	1 份	

其它实验材料 (不提供, 但可协助购买):

1. 酶标仪 (主波长 450nm, 参考波长 630nm)
2. 高精度可调移液器 (已校准) 及吸头: 0.5-10, 2-20, 20-200, 200-1000 μ l。
一次检测样本较多时, 建议使用多通道移液器。
3. 自动洗板机或洗瓶
4. 37℃ 温箱
5. 双蒸水或去离子水

6.坐标纸

7.量筒

注意事项:

1.试剂盒保存在 2-8℃, 已复溶但未用完的标准品, 建议丢弃。不可混合使用不同来源或不同批号的试剂盒组分, 请在有效期内使用本产品。

2.浓缩洗涤液低温取出可能会伴有结晶析出, 稀释时可在水浴中加热助溶, 不影响使用。

3.各步加样均应使用移液器, 并经过校准, 以免产生误差。建议一次加样时间最好控制在 5 分钟内, 如样本数量较多, 推荐使用排枪加样。

4.请每次测定的同时做标准曲线, 最好做复孔。如样本中待测物质含量高于试剂盒检测上限 (样本 OD 值大于标准品孔第一孔的 OD 值), 请先用样本稀释液稀释一定的倍数 (n 倍) 后再测定, 计算时需乘以总稀释倍数。

5.为避免交叉污染, 在加入不同浓度的标准品、不同样本、不同试剂时谨记及时更换吸头, 封板胶纸只限一次性使用。

6.浓缩酶结合物及显色底物请避光保存, 显色底物在添加之前, 应保持无色, 请勿使用已变为蓝色的显色底物。

7.严格按照说明书的操作进行, 试验结果判定必须以酶标仪读数为准。

样本收集、处理及保存方法:

1.血清: 室温血液自然凝固 30 分钟, 离心 20 分钟 (2000-3000 转/分)。仔细收集上清, 若保存过程中出现沉淀, 应再次离心, 避免反复冻融。

2.血浆: 根据样本的要求选择 EDTA 或柠檬酸作为抗凝剂, 离心 20 分钟左右 (2000-3000 转/分)。仔细收集上清, 若保存过程中出现沉淀, 应再次离心。

3.细胞上清液: 检测分泌性的成分时, 用无菌管收集。离心 20 分钟左右 (2000-3000 转/分)。仔细收集上清。

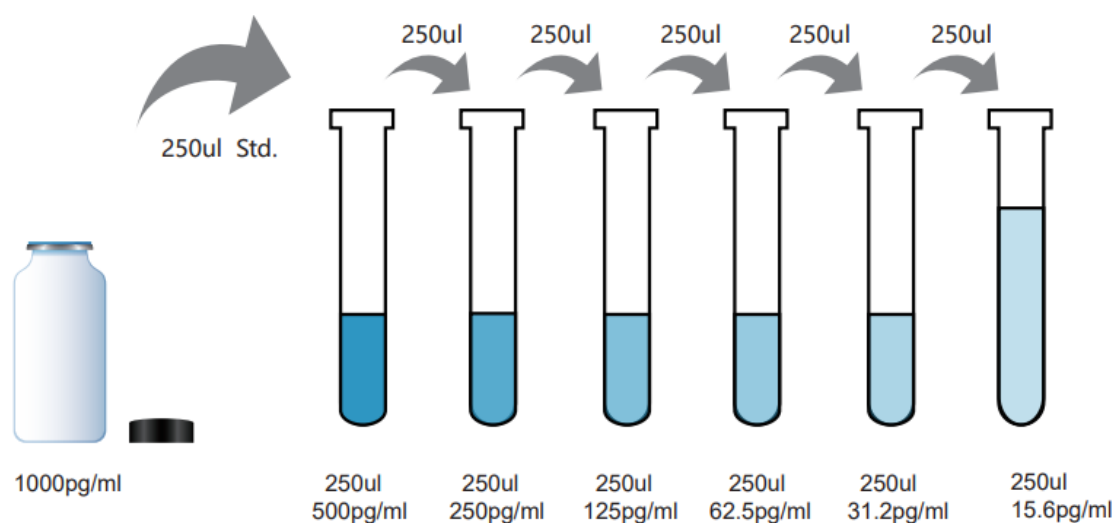
4.若样本无法立即检测, 请将其按最小使用量分装, -20℃—70℃保存, 避免反复冻融。尽量避免使用溶血或高血脂样本。如果血清中含有大量颗粒, 检测前先离心或过滤去除; 室温下解冻, 请勿于 37℃或更高的温度加热解冻。

5.不能检测含 NaN₃ 的样本, 因 NaN₃ 抑制辣根过氧化物酶的活性。

6.请根据实际情况, 将样本做适当倍数稀释 (建议根据预试验结果确定稀释倍数)。

试剂准备:

- 1.试剂回温：请在实验前 30min 内，将试剂盒和待测样本置于室温下回温。
- 2.洗涤液配制：根据浓缩洗涤液的浓缩倍数，用双蒸水或去离子水进行相应倍数稀释后备用。
- 3.标准品梯度稀释：取 0.5ml 标准品/样本稀释液（S1）至冻干标准品中，静置 15 分钟待其完全溶解后轻轻混匀(浓度为 1000pg/ml)，然后取 6 只聚丙烯试管，各加入 250 μ l 标准品/样本稀释液（S1），按照以下浓度进行 2 倍稀释：1000、500、250、125、62.5、31.2、15.6pg/ml 进行稀释。1000pg/ml 为标准曲线最高点浓度，标准品/样本稀释液（S1）作为标准曲线的零点（0pg/ml）。复溶过的标准品原液（1000pg/ml）未用完的应废弃或根据需要按照一次用量分装，并将其贮存在-20~-80℃冰箱。



4. 酶结合物工作液：根据试验所需用量，用酶结合物稀释液（S2）将浓缩酶结合物（100 $\times$ ）稀释成1倍应用工作液，请于30min内使用。

操作步骤:

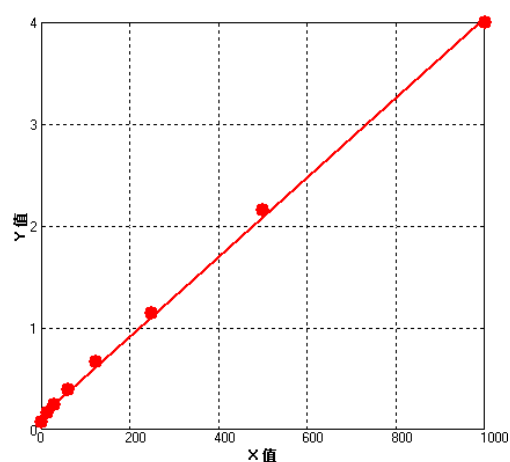
- 1.加样：根据试验所需用量，取出相应抗体包被板条，并增加 1 孔作为空白对照孔，分别将已配制好的标准品、标准品零点（S1）及待测样本以 100 μ l/孔加入实验孔底部。
- 2.温育：用封板胶纸封板后置 37℃温育 90min（空白对照孔除外）。
- 3.洗涤：小心揭掉封板胶纸，弃去液体，甩干，每孔加满洗涤液（350 μ l），静置 30 秒后弃去，如此重复 4 次，最后于吸水纸上拍干。
- 4.加酶结合物：每孔加入酶结合物应用工作液 100 μ l(空白对照孔除外)。
- 5.温育：用封板胶纸封板后置 37℃温育 60min(空白对照孔除外)。
- 6.洗涤：同上述洗涤过程（步骤 3），洗板 4 次。
- 7.显色：每孔加入 100 μ l 显色底物，用封板胶纸封板后置 37℃显色 10-20min。
- 8.终止：每孔加终止液 50 μ l（此时蓝色立转黄色）。

9. 测定：用酶标仪 450nm 波长测定各孔的吸光度（OD 值），测定应在加终止液后 5min 以内进行。

结果判定：

- 1.每个标准品和样本的 OD 值减去空白孔的 OD 值，为最终数值，如果做复孔,求其平均值。
2. 使用计算机软件以吸光度 OD 值为纵坐标(Y)，相应的 TNF- α 标准品浓度为横坐标(X)，生成相应的标准曲线，样本的 TNF- α 含量可根据其 OD 值由标准曲线换算出相应的浓度。若样本 OD 值高于标准品曲线上限，请做适当倍数稀释，计算样本浓度时需乘以相应稀释倍数。

Concentration (pg/mL)	Optical Density (450 nm)
1000	4
500	2.153
250	1.144
125	0.667
62.5	0.394
31.25	0.244
15.62	0.165
0	0.075



本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线为准

试剂盒性能：

批内与批间差应小于 10%

检测范围：

15.62pg/ml -1000pg/ml

灵敏度：

7.8pg/ml