

## 人TNF-alpha双抗夹心ELISA检测试剂盒

请在实验前仔细阅读本说明书

产品货号: KE00154  
规格: 96T  
灵敏度: 8.6 pg/mL  
检测范围: 15.6 - 500 pg/mL  
用途: 此试剂盒用于定量检测血清、血浆以及细胞上清中人TNF-alpha浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

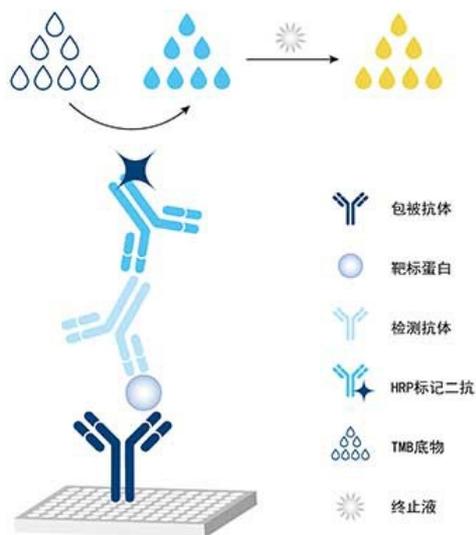
# 目录

一：背景信息	3
二：检测原理	3
三：需自备的实验器材	3
四：试剂盒组分及储存	4
五：实验注意事项	4
六：样本准备	4
七：试剂准备	5
八：实验步骤	6
九：实验参数	7
9.1 参考标曲图	7
9.2 精密度	7
9.3 加标回收率	8
9.4 样本值	8
9.5 灵敏度	8
9.6 线性	9
9.7 特异性	9
十：参考文献	9

## 一：背景信息

TNF，也称为TNF- $\alpha$ 或恶液质素，是一种多功能促炎细胞因子，属于肿瘤坏死因子（TNF）超家族。它以26 kDa膜结合蛋白的形式表达，然后被TNF- $\alpha$ 转化酶（TACE）切割以释放可溶性17 kDa单体，在循环中形成同源三聚体。它主要由活化的巨噬细胞产生，但也可由许多其他类型的细胞产生，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。它可以与受体TNFRSF1A/TNFR1和TNFRSF1B/TNFR结合并通过其发挥作用。这种细胞因子参与调节广泛的生物学过程，包括细胞增殖、分化、凋亡、脂质代谢和凝血。TNF产生的失调与多种人类疾病有关，包括阿尔茨海默病、癌症、抑郁症和炎症性肠病（IBD）。

## 二：检测原理



### ◀双抗夹心模式图 (检测抗体不标记)

按操作顺序形成抗体夹心结构后，加入TMB底物，板孔液体由无色变成蓝色，再加入终止液液体变为黄色后进行吸光度值测定。

## 三：需自备的实验器材

- 3.1 酶标仪 (可读取450 nm和630 nm双波长);
- 3.2 高精度移液器及一次性移液器枪头;
- 3.3 洗板机 (亦可手动洗板);
- 3.4 EP管 (用于稀释标准品及样本);
- 3.5 吸水毛巾或滤纸 (用于拍干);
- 3.6 烧杯和量筒;
- 3.7 用于ELISA实验的数据分析的统计拟合软件 (推荐四参数拟合方法), 如: Origin, ELISA Calc等。

## 四：试剂盒组分及储存

英文名称	中文名称	规格	数量
Microplate	预包被酶标板 - 96 孔板	8 孔 × 12 条	1 块
Protein standard	标准品 - 冻干粉状 *	1000 pg/瓶	2 瓶
Detection antibody (100×)	检测抗体浓缩液 (100×) **	120 μL/支	1 支
HRP-conjugated antibody (100×)	HRP标记二抗浓缩液 (100×) **	120 μL/支	1 支
Sample Diluent PT 1-ec	样本稀释液 PT 1-ec (用于人血清和血浆样本)	30 mL/瓶	1 瓶
Sample Diluent PT 6	样本稀释液 PT 6 (用于细胞上清样本)	30 mL/瓶	1 瓶
Detection Diluent	抗体稀释液	30 mL/瓶	1 瓶
Wash Buffer Concentrate (20×)	浓缩洗涤液 (20×)	30 mL/瓶	1 瓶
Tetramethylbenzidine Substrate (TMB)	显色底物 TMB	12 mL/瓶	1 瓶
Stop Solution	终止液	12 mL/瓶	1 瓶
Plate Cover Seals	封板膜		4 张

**储存条件：**  
1：未开启试剂盒可在2-8℃条件下存放6个月或者在-20℃条件下存放1年  
2：已开启试剂盒可在2-8℃存放7天  
3：每次实验均使用新的标准品,使用后丢弃

\* 使用对应的样本稀释液对标准品进行复溶，复溶过程避免产生气泡

\*\* 开盖前请离心

## 五：实验注意事项

- 5.1 避免皮肤接触终止液以及TMB 显色液；
- 5.2 在实验过程中，注意穿戴个人防护装备，如实验服，手套，口罩和护目镜；
- 5.3 请勿将不同批次的试剂进行混用，过期产品请勿使用；
- 5.4 在使用自动洗板机时，板孔加入洗涤液之后，设置30秒的浸泡程序，以提高分析的精确度。

## 六：样本准备

- 6.1 血清：全血标本室温凝固 30 min后1000×g 离心15 min，取上清立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融。
- 6.2 血浆：可用EDTA、肝素或柠檬酸盐作为抗凝剂，标本采集后1000×g 离心15 min，立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融（注意：标本溶血会影响检测结果，因此溶血标本不宜进行检测）。
- 6.3 细胞上清：收集细胞培养液，500×g 离心5 min取上清，立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融。

## 七：试剂准备

### 7.1 洗涤液 (1×)：

如果洗涤液 (20×) 有晶体析出, 37°C加热至晶体全部溶解。按1:20稀释倍数进行稀释: 如取30 mL 浓缩洗涤液 (20×), 加入570 mL 超纯水或去离子水, 得到洗涤液 (1×)。

### 7.2 检测抗体 (1×)：

开盖前瞬时离心, 按1:100比例进行稀释, 稀释前根据预先计算实验所需的总量配制 (100 μL/孔), 实际配制时应多配制0.1-0.2 mL。如10 μL 检测抗体浓缩液 (100×) 加 990 μL 抗体稀释液进行配制, 轻轻混匀。

### 7.3 HRP标记二抗 (1×)：

开盖前瞬时离心, 按1:100比例进行稀释, 稀释前根据预先计算实验所需的总量配制 (100 μL/孔), 实际配制时应多配制0.1-0.2 mL。如10 μL HRP标记二抗浓缩液 (100×) 加 990 μL 抗体稀释液进行配制, 轻轻混匀。

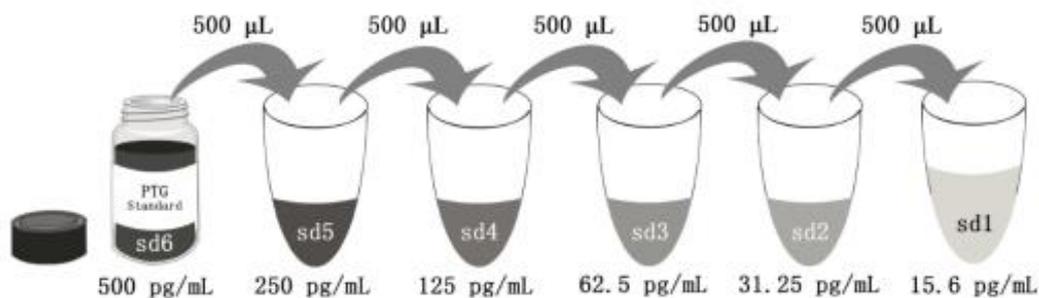
### 7.4 待检测样本：

不同的样本使用相应的样本稀释液进行稀释, 如果样本检测值超过标曲最高范围, 可将样本进行一定的稀释后再进行实验, 使样本的检测值处于标曲范围内, 不同样本的稀释倍数需自行优化。

稀释比推荐如下: 人血清和人血浆和细胞上清样本建议1:2或1:4稀释; 样品采集、处理和储存的差异可能导致测值的改变。

### 7.5 梯度稀释的标准品：

检测人血清和人血浆样本, 用2 mL PT 1-ec 样本稀释液复溶标准品; 检测细胞上清样本, 用2 mL PT 6 样本稀释液复溶标准品; 具体操作如下:



Add # μL of Standard diluted in the previous step	—	500 μL				
# μL of Sample Diluent PT1-ec or PT 6	2000 μL	500 μL				
	"sd6"	"sd5"	"sd4"	"sd3"	"sd2"	"sd1"

## 八：实验步骤

实验前,需要将所需试剂在室温平衡20-30 min(检测抗体 浓缩液、HRP标记二抗浓缩液不需要平衡室温,即用即取);在进行标准品、样本以及不同试剂加样时,更换枪头,避免接触微孔板的内表面,不同的试剂,使用不同的加样槽;

8.1 根据实验用量,取出需要用到的酶标板条,剩余板条加入干燥剂放入铝箔袋密封后存放于4°C,并于一周之内用完;

8.2 加样,分别设零孔、标准孔、待测样本孔。零孔加样本稀释液100  $\mu$ L,余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本100  $\mu$ L/孔,注意不要产生气泡(建议标准品和样本都做复孔,尽量避免实验误差,确保上样不间断,5-10 min完成加样);

8.3 酶标板盖上覆膜,37°C孵育2h;

8.4 洗涤

1) 揭开封板膜(动作轻柔,避免动作过大导致液体溢出串孔),弃液体,拍干;

2) 洗涤液(1 $\times$ )洗涤板条,每孔350-400  $\mu$ L,洗涤后,甩掉液体拍干板条,重复此步骤4次,避免异物进入板孔以及板条干燥;

8.5 每孔加100  $\mu$ L 检测抗体(1 $\times$ )(参照试剂准备部分7.2),盖上封板膜,37°C孵育1h;

8.6 重复步骤8.4;

8.7 每孔加 100  $\mu$ L HRP标记二抗(1 $\times$ )(参照试剂准备部分7.3),盖上封板膜,37°C孵育40 min;

8.8 重复步骤8.4;

8.9 显色:每孔加TMB显色液100  $\mu$ L,37°C避光显色 15-20 min (如果颜色偏浅,可适当延长显色时间,不超过30 min;保持显色底物始终处于避光状态,显色底物在加样前应是无色透明,如有变色,请勿使用);

8.10 终止:每孔加终止液100  $\mu$ L,蓝色变黄色。终止液与TMB显色液的加样顺序一致;(注意:眼睛和皮肤避免接触终止液)

8.11 读数:以630 nm为校正波长,用酶标仪在450 nm波长测量各孔的光密度(OD值)。加入终止液后5 min内进行读数,若无630 nm 波长,也可直接使用450 nm 波长读数;

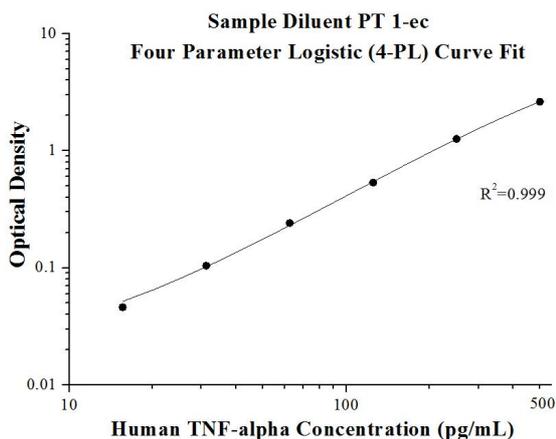
8.12 数据分析:每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值,设置复孔,取其平均值。以标准品的浓度为横坐标,OD 值为纵坐标,使用专业软件(如Origin、ELISACalc等)进行四参数拟合(4-PL),根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度,乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

### 操作流程如下:

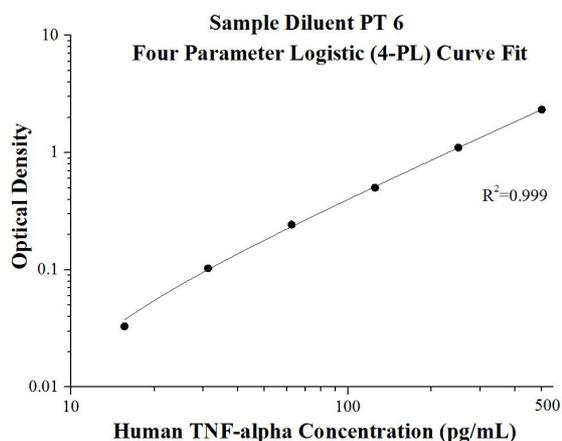
步骤	试剂	体积	孵育时间	洗涤次数	孵育温度
1	标准品或样本	100 $\mu$ L	120 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
2	检测抗体 (1 $\times$ )	100 $\mu$ L	60 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
3	HRP标记二抗 (1 $\times$ )	100 $\mu$ L	40 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
4	显色 TMB	100 $\mu$ L	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37°C孵育,避光
5	终止液	100 $\mu$ L	0 分钟	不需要洗涤	-
6	加入终止液后以630 nm为校正波长,在450 nm处测量OD值,此过程建议不超过5分钟				

## 九：实验参数

### 9.1 参考标曲图



(pg/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.04 0.04	0.040	-
15.6	0.087 0.085	0.086	0.046
31.25	0.142 0.146	0.144	0.104
62.5	0.275 0.287	0.281	0.241
125	0.561 0.584	0.573	0.533
250	1.291 1.304	1.298	1.258
500	2.623 2.692	2.658	2.618



(pg/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.076 0.084	0.080	-
15.6	0.106 0.119	0.113	0.033
31.25	0.190 0.175	0.183	0.103
62.5	0.320 0.325	0.323	0.243
125	0.582 0.582	0.582	0.502
250	1.186 1.182	1.184	1.104
500	2.381 2.439	2.410	2.330

### 9.2 精密度

板内精密度：3个不同浓度的样本在板内重复测定 20次；

板间精密度：3个不同浓度的样本在板间重复测定 24次。

板内精密度 (CV内)				
样本	数量	平均值 (pg/mL)	标准差	变异系数CV%
1	20	52.5	2.0	3.8
2	20	87.3	2.8	3.2
3	20	184.8	5.8	3.1

板间精密度 (CV间)				
样本	数量	平均值 (pg/mL)	标准差	变异系数CV%
1	24	51.3	2.4	4.6
2	24	86.2	2.1	2.5
3	24	184.2	5.1	2.7

### 9.3 加标回收率

样本稀释后，在标曲范围内选择高、中、低3个浓度，进行人TNF-alpha的加标回收率实验，结果如下：

样本类型	稀释倍数	均值 (%)	范围 (%)
人血浆	1:2	109	103-117
	1:4	94	82-101
细胞上清	1:16	96	85-106
	1:32	94	88-97

### 9.4 样本值

应用本试剂盒，检测24份健康人的血清样本中人TNF-alpha的浓度，所有样品测值均低于标曲最低点 15.6 pg/mL。

细胞上清：

用含有10% 胎牛血清、100 U/mL青霉素和100µg/mL硫酸链霉素的RPMI-1640 培养基培养人外周血单个核细胞PBMC ( $1 \times 10^6$  cells/mL)。细胞未经刺激或在 10 µg/mL 植物血凝素PHA 刺激下培养 1 天和 3 天。收集细胞上清，并检测人TNF-alpha的浓度。

刺激条件	1天 (pg/mL)	3天 (pg/mL)
10ug/mL PHA 刺激	2474.8	2029.4
未刺激	405.2	94.1

用含有10% 胎牛血清、2 mM L-谷氨酰胺、100 U/mL青霉素和100 µg/mL硫酸链霉素的RPMI-1640 培养基培养人外周血单个核细胞PBMC ( $1 \times 10^6$  cells/mL)。细胞未经刺激或在 10 ng/mL 佛波酯PMA and 500 ng/mL 离子霉素 Ionomycin (MCE® Catalog #HY-1343/CS-0006887)刺激下培养1天。收集细胞上清，并检测人TNF-alpha的浓度。

刺激条件	1天 (pg/mL)
10 ng/mL 佛波酯+500 ng/mL 离子霉素	432
未刺激	55

### 9.5 灵敏度

用20个重复的零孔平均OD值加上两倍标准差得到的OD值带入标准曲线拟合出对应的浓度值，此试剂盒中人TNF-alpha的灵敏度为 8.6 pg/mL。

## 9.6 线性

人血浆样本加入高浓度的人TNF-alpha蛋白，梯度稀释后检测样本加标线性；细胞上清用对应样本稀释液稀释样本，使稀释后的检测值处于标曲范围内，线性数据如下：

(细胞上清样本预先稀释2倍)

稀释倍数		人血浆 (样本稀释液 PT 1-ec)	细胞上清 (样本稀释液 PT 6)
1:2	均值 (%)	98	98
	范围 (%)	90-106	80-112
1:4	均值 (%)	91	97
	范围 (%)	85-96	86-107
1:8	均值 (%)	93	100
	范围 (%)	92-94	95-103
1:16	均值 (%)	97	99
	范围 (%)	93-101	82-109

## 9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人TNF-alpha，加入50 ng/mL以下细胞因子，无明显交叉反应。

Human:	Mouse:	Rat:
TNF-β	TNF-α	TNF-α
TNF RI		
TNF RII		
TNFSF13		

## 十：参考文献

1. Agbanoma G. et al. (2012) J Immunol. 188: 1307-17
2. Kriegler M. et al. (1988) Cell. 53: 45-53.
3. Theiss AL. et al. (2005) J Biol Chem. 280: 36099-109
4. Swardfager W. et al. (2010) Biol Psychiatry. 68:930-41
5. Locksley RM. et al. (2001) Cell. 104(4):487-501
6. provided by RefSeq, Jul 2008