

## Mouse TNF- $\alpha$ ELISA Kit 小鼠 TNF- $\alpha$ ELISA 试剂盒

### 产品简介

肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )，也称为恶病质素，又名 TNFSF1A，是一种多效细胞因子，在炎症、细胞凋亡和免疫系统发育中起核心作用，可由多种免疫细胞、上皮细胞、内皮细胞和肿瘤细胞产生。TNF- $\alpha$ 受体主要是 TNFR1 和 TNFR2，其信号可以激活 caspase 8、转录因子 NF- $\kappa$ B 和激酶 JNK 等。人 TNF- $\alpha$ 的氨基酸组成与小鼠 TNF- $\alpha$ 有 79%的同源性，TNF- $\alpha$ 的生物学功能似乎没有明显的种属特异性。研究表明 TNF- $\alpha$ 一方面对某些类型的感染具有抵抗力，另一方面又引起炎症，在病理过程中起着矛盾的作用。TNF- $\alpha$ 也可能影响葡萄糖摄取与胰岛素抵抗密切相关。同时 TNF- $\alpha$ 在肿瘤增殖、迁移、侵袭和血管生成中也起着关键作用。

Arcegen Mouse TNF- $\alpha$  ELISA (酶联免疫吸附测定) 试剂盒是一种体外酶联免疫吸附测定试剂盒，用于定量测定血清、血浆中的小鼠肿瘤坏死因子 $\alpha$  (Mouse TNF- $\alpha$ )。特异性抗小鼠肿瘤坏死因子 $\alpha$ 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，经过孵育，样本中存在的小鼠肿瘤坏死因子 $\alpha$ 与固相抗体结合。洗涤去除未结合的物质后，加入检测抗体孵育结合，经洗涤，再加入酶结合物 (Streptavidin-HRP) 孵育结合。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小鼠肿瘤坏死因子 $\alpha$ 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。

### 产品信息

|      |                     |
|------|---------------------|
| 货号   | P162006S / P162006E |
| 规格   | 48 T /96 T          |
| 检测范围 | 31.25-2000 pg/mL    |
| 检测方法 | 双抗夹心法               |
| 检测物种 | 小鼠                  |
| 检测时长 | 4.5 小时              |
| 灵敏度  | 7.82 pg/mL          |
| 稀释线性 | 84- 124%            |
| 回收率  | 81- 119%            |
| 板内差  | 3.8%                |
| 板间差  | 5.3%                |

### 组分信息

| 组分编号      | 组分名称  | 保存温度       | P162006S | P162006E |
|-----------|-------|------------|----------|----------|
| P162006-A | 酶标板   | 2~8°C      | 48 T     | 96 T     |
| P162006-B | 标准品   | 2~8°C      | 1 支      | 2 支      |
| P162006-C | 检测抗体  | 2~8°C      | 120 μL   | 240 μL   |
| P162006-D | 酶结合物  | 2~8°C (避光) | 30 μL    | 60 μL    |
| P162006-E | 5×稀释液 | 2~8°C      | 8 mL     | 15 mL    |
| P162006-F | 20×洗液 | 2~8°C      | 25 mL    | 50 mL    |
| P162006-G | 底物液   | 2~8°C (避光) | 8 mL     | 15 mL    |
| P162006-H | 终止液   | 室温         | 5 mL     | 10 mL    |
| P162006-I | 封板膜   | 室温         | 3 片      | 5 片      |

## 储存条件

试剂盒可全置于 2~8°C 保存，也可按照组分信息中保存条件将试剂依据要求存放，避免污染与反复冻融，稀释成工作浓度试剂即用即弃，不可重复使用。有效期 1 年。

表 1.首次使用后试剂保存表

| 物料名称  | 保存条件                             |
|-------|----------------------------------|
| 酶标板   | 未使用的板条可放回铝箔袋，严密封口于 2~8°C 保存，避免吸湿 |
| 标准品   | 溶解后 48 小时内用完，2~8°C 保存，避免污染       |
| 检测抗体  | 稀释后 48 小时内用完，2~8°C 保存，避免污染       |
| 酶结合物  |                                  |
| 5×稀释液 | 2~8°C 保存 1 个月，避免污染               |
| 20×洗液 |                                  |
| 底物液   | 2~8°C 保存 1 个月，需避光                |
| 终止液   | 可室温保存                            |
| 封板膜   |                                  |

## 使用说明

1. 用于定量检测血清、血浆和细胞培养上清中 TNF-α 含量。
2. 使用本品前，请仔细阅读说明书。

## 注意事项

1. 本产品仅作科研用途。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。
3. 试剂盒需在保质期内使用完毕。禁止不同批次的相关试剂进行混用。
4. 本产品仅能够应用于检测说明书中标注的靶点抗原与样本。其它应用需经使用者设计验证后，根据结果评估使用的可靠性与准确性。

5. 不要混合或替代其他试剂盒批次的试剂或材料的供应商。

## 常见技术提示

1. 样本 OD 值高于 S1 OD 值时，应在适当的稀释液中进一步稀释。
2. 混合时避免产生泡沫。
3. 在添加标准品、样本和其他时，要及时更换枪头，避免交叉污染。
4. 在孵育期间，保证酶标板适当密封或封板膜覆盖完全。
5. 请在清洗步骤中完全清除所有溶液和缓冲液。
6. 在溶解标准品之前，请勿将标准品管随意倒置。当将标准品管倒置后，加入缓冲液后请充分上下混匀，然后低速离心。
7. 在实验过程中，试剂按照说明书要求放置。
8. 在实验完成后及时丢弃缓冲液，即用即弃。
9. 不同产品的试剂盒组分不同，不可交叉使用。

## 其他准备材料

1. 酶标仪，在 450 nm 测量吸光度（参考波长 630 nm）。
2. 恒温箱、自动微孔洗板机。
3. 移液器，1  $\mu$ L 到 1 mL 移液枪与配套枪头。
4. 100 mL 和 1 L 刻度量筒。
5. 标准品或样品稀释试管。
6. 吸水纸。
7. 蒸馏水或去离子水。
8. 计算机及分析软件。

## 实验前准备

### 1. 样本收集与处理

- 1) 细胞培养上清：1,000 $\times$ g 离心 10 分钟去除沉淀物，即刻检测，或者分装，-20 $^{\circ}$ C 以下保存。
- 2) 血清样本：使用不含热原和内毒素的试管收集血清。血样凝集 30 分钟后，1,000 $\times$ g 离心 10 分钟。吸取血清样本之后即刻检测，或者分装，-20 $^{\circ}$ C 以下保存。
- 3) 血浆样本：EDTA、枸橼酸钠或肝素抗凝收集血浆样本。1,000 $\times$ g 离心 30 分钟收集样本。即刻检测，或者分装，-20 $^{\circ}$ C 以下贮存。

本试剂盒可能适用于其它生物样本。血清和细胞培养上清已经过验证。

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 $^{\circ}$ C，以避免 TNF- $\alpha$ 活性的丢失。如果在 24 小时内检测，样本可以存放在 2~8 $^{\circ}$ C，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 $^{\circ}$ C $\pm$ 3 $^{\circ}$ C），轻柔地混匀。

如果样本需要稀释，请使用指定的样本缓冲液进行稀释。

建议正常的血清/血浆样本（仅供参考）：使用 1×稀释液 1: 1 稀释建议细胞培养上清（仅供参考）：原液。

因样本所含有目标蛋白的含量有差异，每个样本的稀释比例建议根据预实验结果或按实际情况判定。

## 2. 酶标板准备

酶标板在使用之前需恢复室温。未使用的板条应及时放入干燥剂密封后储存在 2~8°C，建议每个样本复孔实验。

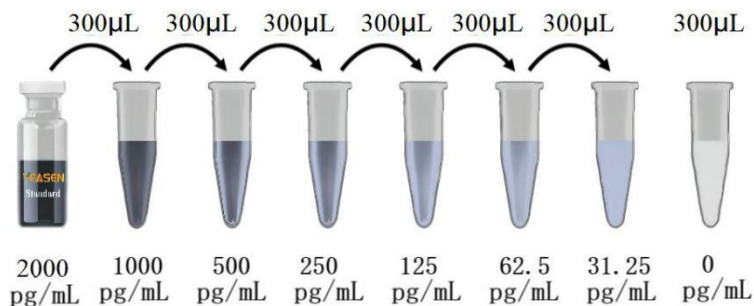
## 3. 试剂准备

使用前所有试剂组分以及待测样本需要恢复室温。为了保证实验的准确性，请在使用前 15 分钟内完成。

- 1) 1×洗液配制：浓缩液平衡至室温，充分溶解，不要有结晶。混匀，取 25 mL 20×洗液至蒸馏水中，然后定容至 500 mL；具体配制体积，可按照每次使用量进行配制。
- 2) 1×稀释液配制：浓缩液平衡至室温，充分溶解，不要有结晶。混匀，取 10 mL 5×稀释液至蒸馏水中，然后定容至 50 mL；具体配制体积，可按照每次使用量进行配制。1×稀释液用来稀释标准品、待测样品、检测抗体和酶结合物。
- 3) 检测抗体配制：使用前 10000 rpm 离心 20 秒，然后用 1×稀释液以 1: 50 稀释至工作浓度使用，如：取 120 μL，用 1×稀释液稀释至 6 mL；具体配制体积，可按照每次使用量进行配制，充分混匀。
- 4) 酶结合物配制：使用前 10000 rpm 离心 20 秒，然后用 1×稀释液以 1: 200 稀释至工作浓度使用，如：取 30 μL，用 1×稀释液稀释至 6 mL；具体配制体积，可按照每次使用量进行配制，充分混匀。
- 5) 标准品曲线的制备：准备 7 个无菌的 1.5 mL 离心管，按照标准品浓度依次进行标记。S1 制备：取一支标准冻干品用蒸馏水按标签标示量溶解，充分混匀，即标记其为 2000 pg/mL。各离心管分别加入 300 μL 1×稀释液，先取 300 μL S1，加至第一个离心管中充分混匀后，再取 300 μL 至下一个标记浓度的离心管中，充分混匀，进行一系列 2 倍梯度稀释标准品，起始最高浓度标记为 2000 pg/mL，最低浓度为 31.25 pg/mL，可按照下面的配制方法来进行。每次试验均需制备相应的标准曲线，不同试剂盒以及不同时间的标准曲线不能混用。样本测试时，每个孔所需标准品量为 100 μL，注意配制体积要高于所需体积，避免使用量不足。

表 2. TNF-α标准品体系配制 (31.25- 2000 pg/mL)

| 标准曲线  | 稀释液 (μL) | 标准品添加体积 (μL) | 标准品终浓度 (pg/mL) |
|-------|----------|--------------|----------------|
| S1    | 按标签标示量   | /            | 2000           |
| S2    | 300      | 300          | 1000           |
| S3    | 300      | 300          | 500            |
| S4    | 300      | 300          | 250            |
| S5    | 300      | 300          | 125            |
| S6    | 300      | 300          | 62.5           |
| S7    | 300      | 300          | 31.25          |
| Blank | 300      | 0            | 0              |



## 实验方法

使用前所有试剂及待测样本需要恢复室温。强烈建议所有的标准品和待检样本进行复孔测定。

1. 试剂准备：备好各种待测试剂、稀释好的标准品和待测样本。
2. 酶标板条确定：计算待测样本和标准品所需酶标板条，将酶标板条从铝箔袋取出，剩余酶标板条放回铝箔袋中并封好袋口，低温保存。
3. 浸泡酶标板：加入 1×洗液（350 µL/孔）浸泡酶标板，静置 30 秒后弃去孔中液体，拍干酶标板。液量对试验结果有重要影响，确保最后一次拍板没有洗液残留。
4. 加样孵育：加入各梯度标准品和已稀释待测样本，100 µL/孔，确保 15 分钟内完成点样，室温孵育 2 小时。
5. 清洗酶标板：弃去孔中液体，加入 1×洗液（350 µL/孔）洗板 5 次，拍干酶标板。
6. 检测抗体孵育：将预先配制至工作浓度的检测抗体加入酶标板中，100 µL/孔，室温孵育 2 小时。
7. 清洗酶标板：弃去孔中液体，加入 1×洗液（350 µL/孔）洗板 5 次，拍干酶标板。
8. 酶结合物孵育：将预先配制至工作浓度的酶结合物加入酶标板中，100 µL/孔，室温孵育 20 分钟。
9. 清洗酶标板：弃去孔中液体，加入 1×洗液（350 µL/孔）洗板 5 次，拍干酶标板。
10. 显色：使用前 10 分钟将底物液恢复至室温，将底物液加入酶标板中，100 µL/孔，室温避光孵育 15 分钟。
11. 终止：加入 50 µL/孔终止液至酶标板中，此时颜色由蓝转黄，轻轻震动酶标板至显色均匀。
12. 读值：10 分钟内读取 450 nm/630 nm 的光吸收值。

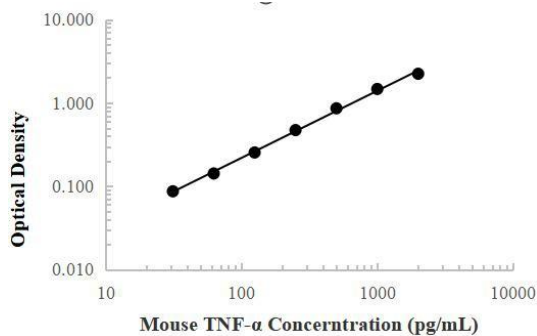
## 标曲制定

计算标准品和样本复孔的平均 OD 值，并减去空白孔的平均 OD 值作为校准 OD 值。以标准品浓度的对数为横坐标，校准 OD 值的对数为纵坐标绘制标准曲线。多种绘图和统计学软件可以用于辅助绘制标准曲线并进行未知样本浓度的计算。四参数拟合法往往拟合效果较好，其它方法如线性拟合也可能获得较好拟合结果，需要根据具体实验数据进行分析。

## 实验数据

### 1. 标曲数据

数据拟合绘制标准曲线，生成的标曲用于实验数据分析。



标准曲线图

| 浓度 (pg/mL) | 显色值   |       | 平均值   | 校准值   |
|------------|-------|-------|-------|-------|
| 2000       | 2.270 | 2.199 | 2.235 | 2.236 |
| 1000       | 1.472 | 1.478 | 1.475 | 1.469 |
| 500        | 0.835 | 0.868 | 0.852 | 0.862 |
| 250        | 0.478 | 0.473 | 0.476 | 0.472 |
| 125        | 0.260 | 0.257 | 0.258 | 0.254 |
| 62.5       | 0.142 | 0.145 | 0.144 | 0.142 |
| 31.25      | 0.084 | 0.081 | 0.083 | 0.087 |
| 0          | 0.014 | 0.014 | 0.014 | /     |

## 2. 灵敏度检测

TNF- $\alpha$ 的最低检测限为 7.82 pg/mL，通过使用重复检测 20 次零孔 OD 值的均值与标准差计算得出。

## 3. 精密度检测

酶标板内精密度

3 个已知浓度的样本酶标板内重复测定 8 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 24 次，评估酶标板间的精密度。

| 项目       | 板内精密度 |       |      | 板间精密度 |       |      |
|----------|-------|-------|------|-------|-------|------|
|          | 1     | 2     | 3    | 1     | 2     | 3    |
| 样本       | 8     | 8     | 8    | 24    | 24    | 24   |
| 平均值      | 940.0 | 241.4 | 57.9 | 942.6 | 236.5 | 59.6 |
| 标准差      | 40.0  | 9.5   | 1.9  | 64.0  | 9.2   | 3.2  |
| 变异系数 (%) | 4.3   | 3.9   | 3.3  | 6.8   | 3.9   | 5.3  |

## 4. 回收率检测

通过不同水平的 TNF- $\alpha$ 添加于样本中来测定回收率，其回收率如下：

| 样本类型   | 平均回收率 (%) | 范围 (%)      |
|--------|-----------|-------------|
| 血清     | 112.3     | 103.0-119.1 |
| 血浆     | 94.0      | 81.0-104.5  |
| 细胞培养上清 | 90.0      | 82.6-98.0   |

## 5. 稀释线性检测

| 血清稀释比例 | 平均期望值 (%) | 范围 (%)      |
|--------|-----------|-------------|
| 1:02   | 104.4     | 102.0-107.1 |
| 1:04   | 106.0     | 98.0-112.4  |
| 1:08   | 116.9     | 108.1-122.1 |
| 1:16   | 97.6      | 88.1-108.7  |

| 血浆稀释比例 | 平均期望值 (%) | 范围 (%)      |
|--------|-----------|-------------|
| 1:02   | 107.1     | 95.2-115.2  |
| 1:04   | 109.4     | 105.2-114.0 |
| 1:08   | 118.1     | 118.2-124.2 |
| 1:16   | 107.2     | 99.8-113.9  |

| 细胞培养上清稀释比例 | 平均期望值 (%) | 范围 (%)     |
|------------|-----------|------------|
| 1:02       | 107.1     | 94.5-122.9 |
| 1:04       | 104.0     | 88.3-120.2 |
| 1:08       | 104.7     | 84.3-123.2 |
| 1:16       | 94.2      | 85.7-106.1 |

## 6. 样本值

应用本试剂盒，检测若干健康志愿者的样本，志愿者的用药史不详。

| 样本类型   | 样本数目 | 平均值 (pg/mL) | 样本值 (pg/mL) |
|--------|------|-------------|-------------|
| 血清     | 4    | n.d.        | n.d.        |
| 血浆     | 4    | n.d.        | n.d.        |
| 细胞培养上清 | 4    | n.d.        | n.d.        |

n.d.指样本浓度值低于检测范围内得 31.25 pg/mL

## 7. 测定特异性

本试剂盒识别天然和重组小鼠肿瘤坏死因子 $\alpha$ 。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。

| Recombinant human: |               | Recombinant Mouse: |               |
|--------------------|---------------|--------------------|---------------|
| IL-1 $\alpha$      | IL-10         | IL-1 $\alpha$      | IL-10         |
| IL-1 $\beta$       | IL-12         | IL-1 $\beta$       | IFN- $\gamma$ |
| IL-2               | IFN- $\gamma$ | IL-2               | VEGF          |
| IL-4               | TNF- $\alpha$ | IL-4               | RANKL         |
| IL-5               | LIF           | IL-5               | TRAIL         |
| IL-6               | RANKL         | IL-6               |               |
| IL-8               | TRAIL         |                    |               |



## 检测简图



## 疑问解答

| 问题    | 造成原因       | 解决方法                              |
|-------|------------|-----------------------------------|
| 标曲不好  | 移液量不准确     | 检查移液器,按时校准,仔细操作,充分混匀时盖紧管口并尽量避免泡沫。 |
|       | 稀释方法不恰当    |                                   |
| 显色值偏低 | 孵育时间太短     | 给予足够的孵育时间,样本和溶解的标准品隔夜后更换。         |
|       | 移液量不足或稀释不当 | 校准移液器和规范操作                        |
| CV 偏高 | 酶标板清洗不当    | 使用正确的洗涤工序;如果使用洗板机,检查所有的端口是否堵塞。    |
|       | 受污染的洗液     | 准备新鲜洗液                            |
| 灵敏度较低 | 试剂盒储存不当    | 按照产品组分表进行保存。                      |