

*产品信息和操作指南*

# **Human TNF- $\alpha$ Precoated ELISA kit**

Cat# : 1117202

本试剂盒专用于科研，而非用于诊断

**Human TNF- $\alpha$   
1117202**

## 目 录

产品简介.....	1
知识背景.....	1
试剂盒组分.....	2
需要实验者自行准备的试剂与仪器.....	2
注意事项.....	3
试剂的配制.....	5
操作过程.....	7
结果分析.....	9
试剂盒的保存.....	9
操作步骤一览表.....	10
参考文献.....	11
ELISA 测定中可能出现的问题及解决方法.....	12
达优®ELISA 系列产品.....	15

## 1、 产品简介:

达优®人 TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒是通过酶联免疫吸附技术,体外定量检测人血清、血浆、缓冲液或细胞培养液中的 TNF- $\alpha$ ,可同时检测天然的和重组的 TNF- $\alpha$ 。本试剂盒为预包被板,“夹心一步”完成,整个过程孵育时间不超过 4 小时,洗涤 6 次,操作时间大大减少。本试剂盒专用于科研,而非用于诊断。

使用前请仔细阅读说明书并检查试剂盒组分,若有任何疑问请与深圳市达科为生物工程有限公司联系, E-mail: RD@dakewe.com.

检测范围: 800-25 pg/mL

灵敏度: 8 pg/mL

重复性: 板内变异系数 $<10\%$ ,板间变异系数 $<15\%$ 。

## 2、 知识背景:

肿瘤坏死因子- $\alpha$  (Tumor necrosis factor $\alpha$ ,TNF- $\alpha$ ) 亦称为恶质素,由活化的巨噬细胞和其它类型的细胞分泌,包括 T 细胞、B 细胞、NK 细胞、LAK 细胞、星形胶质细胞、内皮细胞、平滑肌细胞和一些肿瘤细胞(1-4),在正常宿主对抗感染和恶性肿瘤的生长过程中起重要的作用。其过量表达跟一系列的病理状态有关,包括恶病质、败血性休克和自身免疫失调。

### 3、试剂盒组分：

组分	规格	配制
Cytokine standard	2 瓶	干粉状，按瓶上说明操作
Biotinylated antibody	2 管	1: 50 用 Dilution buffer R (1×) 稀释
Streptavidin-HRP	2 管	1: 100 用 Dilution buffer R (1×) 稀释
Dilution buffer R (1×)	3 瓶	即用型
Washing buffer (50×)	1 瓶	1 : 50 用蒸馏水稀释
TMB	1 瓶	即用型
Stop solution	1 瓶	即用型
Precoated ELISA plate	8×12	即用型
封板膜	2 张	即用型
说明书	1 份	

### 4、需要实验者自行准备的试剂与仪器：

1. 酶标仪（建议参考仪器使用说明提前预热）
2. 微量加液器及吸头：P10，P50，P100，P200，P1000
3. 蒸馏水或去离子水
4. 全新滤纸
5. 漩涡振荡器和磁力搅拌器

## 5、 注意事项:

1. 试剂应按标签说明储存, 使用前 **室温平衡** 20-30 分钟。实验前室温平衡对 Washing buffer (50×)、Dilution buffer R (1×)、Precoated ELISA plate 和 TMB 有重要意义。
2. 冻干标准品冰上操作, 按照标签说明溶解干粉, **充分混匀**, 按照一次使用量分装, -20℃ 贮存, 避免反复冻融。
3. 预包被板条使用前, 请平衡至室温后再打开外包装袋, 实验中不用的板条应立即放回包装中, **密闭封口**, 4℃ 可保存 1 个月。其余不用试剂应包装好或盖好。
4. Washing buffer (50×) 在 4℃ 保存可能有 **结晶析出**, 务必使结晶完全溶解后 (如加热、平衡温度后混匀等) 再配制成 1×Washing buffer 工作液。
5. Biotinylated antibody 和 Streptavidin-HRP 体积小, 使用前请 **高速短暂离心** 管子, 以使管壁或管盖的液体沉积到管底。
6. 实验操作中请使用一次性的吸头, 避免交叉污染。
7. 使用前检查试剂盒内各种试剂; 试剂稀释、加样和中止反应充分混匀或者摇匀对实验结果尤为重要, 最好使用低速频率振荡器或者反应过程中每 15 分钟手工摇匀一次。
8. 实验板孔加入试剂的顺序应一致, 以保证所有反应孔的孵育时间一致。

9. 使用洁净的塑料容器盛装洗涤液。
10. 洗涤过程中反应孔中残留的洗涤液应在**滤纸**上充分拍干，直至滤纸上看不到水印。勿将滤纸直接放入反应孔中吸水。
11. TMB 对光敏感，避免长时间暴露于光下，避免与金属接触影响结果。**有毒，避免与皮肤接触!** 准备使用的 TMB 若变为蓝色，表明 TMB 已经污染，请丢弃。请在终止反应后 10 分钟内读取 OD 值。
12. 请严格按照说明书标明的时间和温度进行孵育。冬季室内温度偏低，请使用**恒温箱或培养箱孵育**为好。
13. 试剂盒在保质期内使用，且不同批号试剂不要混用。
14. 800 pg/mL 以上的结果为非线性的，根据此标准曲线无法得到精确的结果。大于 800 pg/mL TNF- $\alpha$  的样本应以 Dilution buffer R (1 $\times$ ) 稀释后重做。在结果分析时，结合考虑相应的稀释度。
15. 特异性：不与人其它细胞因子反应。

## 6、试剂的配制：

1. 提前 20 分钟将 **Washing buffer (50×)**和**即用溶液**从试剂盒中取出，平衡至室温。
2. **Cytokine standard:** 外观为冻干粉。先按标签说明将冻干粉溶解，静置 5-10 分钟，再用 **Dilution buffer R (1×)**稀释到推荐检测浓度。标准品溶解后混匀，准确倍比稀释，严格操作非常重要。标准品的倍比稀释最好在进口的或者硅化的 EP 管中完成，减少非特异性吸附。在实验孔内进行倍比稀释时，注意操作规范，枪头勿刮划预包被板的孔底。母液若有剩余请按照一次用量分装，-20℃保存。  
\* 推荐标准品浓度梯度为：800 pg/mL、400 pg/mL、200 pg/mL、100 pg/mL、50 pg/mL、25 pg/mL。
3. **Biotinylated antibody:** 1 : 50 用 **Dilution buffer R (1×)**稀释，混匀制成 **Biotinylated antibody** 工作液。
4. **Streptavidin-HRP** : 1 : 100 用 **Dilution buffer R (1×)**稀释，混匀制成 **Streptavidin-HRP** 工作液。

**5. Washing buffer (50×):** 1 : 50 用蒸馏水稀释。

**6. 即用型溶液**

➤ **Dilution buffer R (1×):** 用于稀释 **Cytokine standard**、**样本**、**Biotinylated antibody** 和 **Streptavidin-HRP**。

➤ **TMB**

➤ **Stop solution**



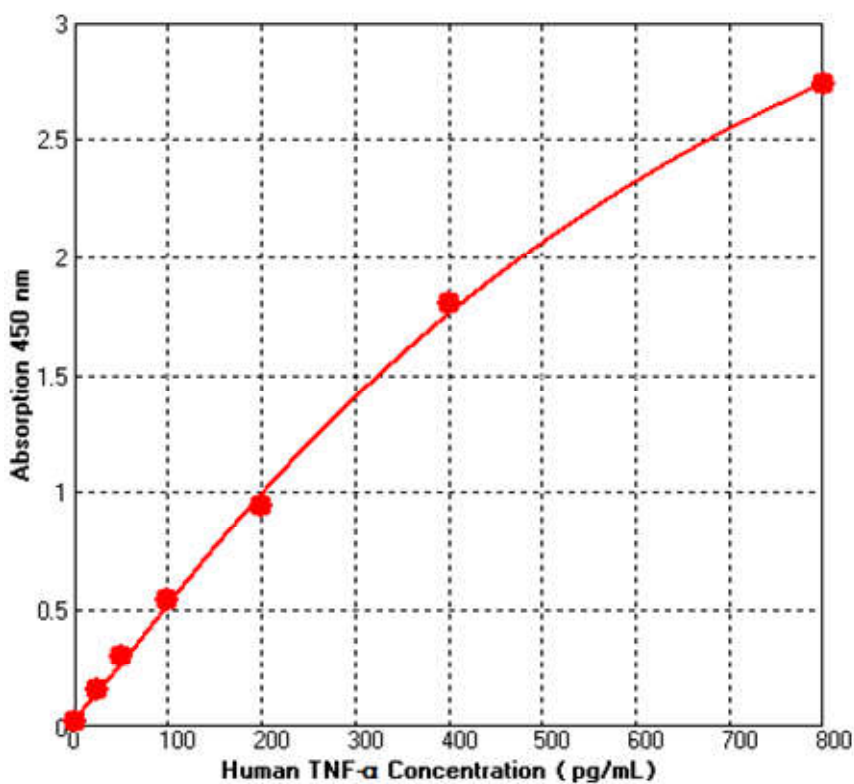
## 7、操作过程：

1. 使用前，将所有试剂充分混匀，避免产生泡沫。
2. 根据实验孔（空白和标准品）数量，确定所需的板条数目。样本（含标准品）和空白都应做复孔。
3. 加样：100  $\mu\text{L}/\text{well}$  加入稀释后的 Cytokine standard 至标准品孔，100  $\mu\text{L}/\text{well}$  加入样本至样本孔，100  $\mu\text{L}/\text{well}$  加入 Dilution buffer R (1 $\times$ )至空白对照孔。
4. 加检测抗体：50  $\mu\text{L}/\text{well}$  加入 Biotinylated antibody 工作液。混匀后盖上封板膜，室温（18-25 $^{\circ}\text{C}$ ）孵育 3 小时。
5. 洗板：扣去孔内液体，300  $\mu\text{L}/\text{well}$  加入 1 $\times$ Washing buffer 工作液；停留 1 分钟后弃去孔内液体。重复 3 次，每一次在滤纸上扣干。
6. 加酶：100  $\mu\text{L}/\text{well}$  加入 Streptavidin-HRP 工作液。盖上封板膜，室温（18-25 $^{\circ}\text{C}$ ）孵育 20 分钟。
7. 洗板：重复步骤 5。
8. 显色：100  $\mu\text{L}/\text{well}$  加入 TMB，室温（18-25 $^{\circ}\text{C}$ ）避光孵育 5-30 分钟，根据孔内颜色的深浅（深蓝色）来判定终止反应。通常显色 10-20 分钟可以达到很好的效果。
9. 终止反应：100  $\mu\text{L}/\text{well}$  迅速加入 Stop solution 终止反应。

**10. 读板:** 终止后 10 分钟内, 用检测波长(measurement wavelength) 450 nm 读值。推荐用双波长即检测波长 (measurement wavelength) 450 nm、参考波长或校正波长 (reference wavelength) 610-630 nm 同时读板, 测量结果会更准确。

## 8、结果分析：

- 1.推荐拟合曲线坐标对数或自然数，拟合方程常见为直线、二次方程及四参数方程，通过各种应用软件拟合选取最佳标准曲线，根据样本 OD 值查找相应浓度。
- 2.稀释的样本计算浓度时应乘以稀释倍数。



注意：本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线来计算样本浓度。

## 9、试剂盒的保存：

4°C 可稳定保存 12 个月。

## 10、操作步骤一览表：

加样本或配好的 **Cytokine standard**，设置对照，**100  $\mu\text{L}/\text{well}$**

无需孵育，直接进行下一步操作

加 **Biotinylated antibody** 工作液，**50  $\mu\text{L}/\text{well}$** ，混匀

室温孵育 3 小时；  
洗板 3 次

加 **Streptavidin-HRP** 工作液，**100  $\mu\text{L}/\text{well}$**

室温孵育 20 分钟；  
洗板 3 次

加 **TMB** 显色液，**100  $\mu\text{L}/\text{well}$**

室温避光显色 5-30 分钟

加 **Stop solution** **100  $\mu\text{L}/\text{well}$** ，终止反应

10 分钟内读板

在 $\lambda=450\text{ nm}$ 处读取吸光值

## 11、参考文献

- (1) Vilcek J. and T.H. Lee. (1991) *J. Biol. Chem.* 266:7313.
- (2) Ruddle, N.H. (1992) *Curr. Opinion Immunol.* 4:327.
- (3) Tumor Necrosis Factor: Structure, Function and Mechanism of Action, Aggarwal, B.B. and J. Vilcek eds. (1991) Marcel Dekker, Inc., New York.
- (4) Beutler, B. and A. Cerami. (1989) *Annu. Rev. Immunol.* 7:625.
- (5) 胡海棠 等.实用医学杂志,2009,25,1210-1213.
- (6) 刘平 等. 中国现代医生,2009,47,10-11.
- (7) 谢华良 等. 海南医学,2007,18,5-7
- (8) 窦献蕊 等 .国际医药卫生导报,2009,15,27-29.
- (9) 窦献蕊 等. 实用医学杂志,2009,25,1588-1590.
- (10) 赵志国 等. 中国误诊学杂志,2009,9,3551-3552.
- (11) 杜思霖 章幼奕. 现代医药卫生,2010,26(4):522-523
- (12) 于淼 等. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2009, 19(11):632-636
- (13) 杨模国. 中国现代医生,2008,46(20):33-35
- (14) 覃筱燕 等. 中国药学杂志. 2010, 45(4): 264-267.

## 12、ELISA 测定中可能出现的问题及解决方法

问 题	可能的原因	解决方法
1. 非常弱 的结果	(1) 温育的时间或温度不够; (2) 显色反应时间太短; (3) 所用配制缓冲液的蒸馏水有问题; (4) 加入抗体/酶的工作液浓度太低; (5) 酶标仪滤光片不正确; (6) 不正确的试剂储存方式; (7) 试剂盒没有充分平衡; (8) 移液器吸液量不足, 吸嘴内壁挂水太多或内壁不清洁。	a. 校正温育箱温度; b. 校正定时钟准确定时; c. 使用新鲜合格的蒸馏水; d. 按照说明书保存试剂盒和准确配制工作液; e. 试剂室温平衡至少 20 分钟, 确保所有试剂已平衡至室温 (18-25℃); f. 校正移液器, 吸嘴要配套, 装吸嘴时要紧密, 吸嘴内壁要清洁, 最好一次性使用。

<p>2. 标准曲线和测定的重复性差</p>	<p>这是典型的由测定操作引起的问题，包括</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>(1) 加样本及试剂量不准；孔间不一致；</li> <li>(2) 加样过快，孔间发生污染；</li> <li>(3) 加错样本；</li> <li>(4) 加样本及试剂时，加在孔壁上部非包被区；</li> <li>(5) 不同批号试剂盒中组分混用；</li> <li>(6) 温育时间、洗板、显色时间不一致；</li> <li>(7) 孔内有污染杂物；</li> <li>(8) 酶标仪滤光片不正确；</li> <li>(9) 试剂/样本没有混匀；</li> <li>(10) 血清样本未完全凝固即加入，反应孔内出现纤维蛋白凝固或残留血细胞，易出现假阳性反应等。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. 重复某一样本时，加样时间尽可能与第一次接近；</li> <li>b. 重复测定样本，操作条件、人员等应尽可能与上次保持一致，以排除这些因素造成的不一致的可能性；</li> <li>c. 样本稀释前应充分混匀；</li> <li>d. 尽可能使用同一移液器并装紧吸嘴。</li> </ul>
<p>3. 白板 (阳性对照不显色)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>(1) 漏加酶结合物；</li> <li>(2) 洗板液配制中出现问题，如量筒不干净，含酶抑制物（如叠氮钠）等；</li> <li>(3) 添加的试剂错误或者被遗漏；</li> <li>(4) 试剂过期；</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. 请按说明书所示稀释倍数配制；</li> <li>b. 注意不要漏加；</li> <li>c. 每次加液前均应核对标签。</li> </ul>

<p>4. 空白背景高</p>	<p>(1) 洗板不干净;  (2) 显色液变质;  (3) 试剂过期;  (4) 试剂配制浓度有误,如酶的浓度过高;  (5) 蒸馏水受酶等污染;  (6) 试剂混用;  (7) 培养箱温度超过 37℃ 或反应时间过长。</p>	<p>a. 浓缩洗液准确配制;  b. 50 倍浓缩洗涤液如有结晶则应让结晶于室温全部溶解后再量取稀释;  c. 充分洗涤,彻底拍干;  d. 加样或加酶拍板的滤纸应弃去不用,不要反复使用,否则易造成污染;  e. 吸嘴尽可能一次性使用;  f. 使用新鲜蒸馏水;  g. 不同批号试剂勿混用;  h. 请按说明书所示稀释倍数配制;  i. 显色反应时间适当缩短。</p>
-----------------	---	--



## 13、达优<sup>®</sup>ELISA 系列产品

### 达优<sup>®</sup>小鼠 ELISA 试剂盒

1210002	Mouse IFN- $\gamma$ ELISA kit (预包被减步法)	96T
1210112	Mouse IL-1 $\alpha$ ELISA kit (预包被减步法)	96T
1210122	Mouse IL-1 $\beta$ ELISA kit (预包被减步法)	96T
1210202	Mouse IL-2 ELISA kit (预包被减步法)	96T
1210402	Mouse IL-4 ELISA kit (预包被减步法)	96T
1210502	Mouse IL-5 ELISA kit (预包被减步法)	96T
1210602	Mouse IL-6 ELISA kit (预包被减步法)	96T
1211002	Mouse IL-10 ELISA kit (预包被减步法)	96T
1211202	Mouse IL-12 p70 ELISA kit (预包被减步法)	96T
1211232	Mouse IL-12/IL-23 p40 ELISA kit (预包被减步法)	96T
1211702	Mouse IL-17A ELISA kit (预包被减步法)	96T
1212202	Mouse IL-22 ELISA kit (预包被)	96T
1217102	Mouse TGF- $\beta$ 1 ELISA kit (预包被)	96T
1217202	Mouse TNF- $\alpha$ ELISA kit (预包被减步法)	96T
1217342	Mouse VEGF-A ELISA kit (预包被)	96T
1218202	Mouse IgE ELISA kit (预包被)	96T
1217392	Mouse MCP-1 ELISA kit (预包被)	96T

## 达优®人 ELISA 试剂盒

1110002	Human IFN- $\gamma$ ELISA Kit (预包被减步法)	96T
1110012	Human IFN- $\alpha$ ELISA Kit (预包被)	96T
1110122	Human IL-1 $\beta$ ELISA Kit (预包被减步法)	96T
1110202	Human IL-2 ELISA Kit (预包被减步法)	96T
1110402	Human IL-4 ELISA Kit (预包被)	96T
1110502	Human IL-5 ELISA Kit (预包被减步法)	96T
1110602	Human IL-6 ELISA Kit (预包被减步法)	96T
1110702	Human IL-7 ELISA Kit (预包被)	96T
1110802	Human IL-8 ELISA Kit (预包被减步法)	96T
1110902	Human IL-9 ELISA Kit (预包被)	96T
1111002	Human IL-10 ELISA Kit (预包被减步法)	96T
1111202	Human IL-12p70 ELISA Kit (预包被减步法)	96T
1111232	Human IL-12/IL-23p40 ELISA Kit (预包被减步法)	96T
1111262	Human IL-6R/CD126 ELISA Kit (预包被减步法)	96T
1111302	Human IL-13 ELISA Kit (预包被减步法)	96T
1111502	Human IL-15 ELISA Kit (预包被)	96T
1111702	Human IL-17A ELISA Kit (预包被)	96T
1111742	Human IL-17F ELISA Kit (预包被)	96T
1112202	Human IL-22 ELISA Kit (预包被减步法)	96T
1112302	Human IL-23 ELISA Kit (预包被减步法)	96T
1113252	Human sIL-2R ELISA Kit (预包被减步法)	96T
1113102	Human IL-31 ELISA Kit (预包被减步法)	96T

1113302	Human IL-33 ELISA Kit (预包被)	96T
1113542	Human CD54/sICAM-1 ELISA Kit (预包被减步法)	96T
1114062	Human CD106/sVCAM-1 ELISA Kit (预包被)	96T
1115302	Human Adiponectin/Acrp30 ELISA Kit (预包被)	96T
1115312	human Resistin ELISA Kit(预包被)	96T
1115402	Human CRP ELISA Kit (预包被)	96T
1117102	Human TGF- $\beta$ 1 ELISA Kit (预包被)	96T
1117202	Human TNF- $\alpha$ ELISA Kit (预包被减步法)	96T
1117302	Human GM-CSF ELISA Kit (预包被)	96T
1117312	Human G-CSF ELISA Kit (预包被)	96T
1117322	Human EGF ELISA Kit (预包被)	96T
1117342	Human VEGF-A ELISA Kit (预包被)	96T
1117392	Human MCP-1 ELISA Kit (预包被)	96T
1117412	Human MIP-1 $\alpha$ ELISA Kit (预包被)	96T
1117452	Human IP-10 ELISA Kit (预包被)	96T
1117602	Human FGF basic ELISA Kit (预包被)	96T
1117632	Human $\beta$ -NGF ELISA Kit (预包被)	96T
1117652	Human HGF ELISA Kit (预包被)	96T
1118202	Human IgE ELISA Kit (预包被)	96T
1118302	Human perforin ELISA Kit (预包被)	96T
1118502	Human Granzyme B ELISA Kit (预包被)	96T
1118602	Human PD-1 ELISA kit(预包被)	96T
1118612	Human PD-L1 ELISA Kit(预包被)	96T
1119012	human MMP-1 ELISA Kit(预包被)	96T
1119022	human MMP-2 ELISA Kit(预包被)	96T
1119032	human Total MMP-3 ELISA Kit(预包被)	96T

## 达优®大鼠 ELISA 试剂盒

1310002	Rat IFN- $\gamma$ ELISA kit (预包被减步法)	96T
1310122	Rat IL-1 $\beta$ ELISA kit (预包被)	96T
1310202	Rat IL-2 ELISA kit (预包被减步法)	96T
1310402	Rat IL-4 ELISA kit (预包被)	96T
1310602	Rat IL-6 ELISA kit (预包被)	96T
1311002	Rat IL-10 ELISA kit (预包被减步法)	96T
1311702	Rat IL-17A ELISA kit (预包被)	96T
1317102	Rat TGF- $\beta$ 1 ELISA kit (预包被)	96T
1317202	Rat TNF- $\alpha$ ELISA Kit (预包被减步法)	96T

## ELISA 辅助试剂

1030412	TMB (ready-to-use, 即用型), 1 plate	10 mL
1030011	ELISA 辅助试剂盒	96T

深圳市达科为生物工程有限公司  
Dakewe Bio-engineering Co., LTD  
(180701)