

人肿瘤坏死因子- α 酶联免疫吸附检测试剂盒 (Human TNF- α ELISA Kit)

产品编号: DE5301

规格: 96T

检测范围: 15.6pg/ml-1000pg/ml

特异性: 特异检测人 TNF- α

灵敏度: <15.6pg/ml

储存条件: 2-8℃ (频繁使用时) 或者 -20℃ (长期不使用时)

保质期: 6 个月 (2-8℃), 12 个月 (-20℃)

用途: 用于定量分析人血清、血浆或细胞培养上清中 TNF- α 浓度

产品简介

肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α) 是一种多功能细胞因子, 在体内免疫反应调节中起重要作用。主要由单核/巨噬细胞、淋巴细胞、纤维母细胞、肝细胞、小胶质细胞、血管内皮细胞等细胞产生。在生理条件下, TNF- α 的合成受多种细胞因子、核分裂因子和抗原的刺激而增加。各种免疫调节相关通路的激动剂或抑制剂也可以对 TNF- α 的表达和分泌发挥重要调节作用。

拜尔迪提供的 Human TNF- α ELISA Kit 是典型的双抗夹心法酶联免疫吸附测定试剂盒(Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA)。样品加入测定孔中, TNF- α 被特异性吸附到预先包被的单克隆抗体上, 然后针对其它表位的生物素标记的检测抗体再特异性结合到 TNF- α 上, 辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素再特异性结合到生物素上, 最后经 TMB 底物显色, 即可通过标准曲线和样品吸光度对 TNF- α 浓度进行定量。

试剂盒组成

Components	Size
Human TNF- α Standard	10ng
Human TNF- α Capture Antibody Coated Plate	96Wells
Human TNF- α Detection Antibody(100 $\times$)	125 μ l
HRP-Streptavidin(100 $\times$)	125 μ l
Sample Diluent Solution	30ml
Detection Antibody Diluent Solution	12ml
HRP-Streptavidin Diluent Solution	12ml
TMB Solution	12ml
Stop Solution	12ml
Wash Buffer(20 $\times$)	25ml

需要而未提供的试剂和器材

1. 去离子水
2. 系列可调节移液器及吸头
3. 干净的试管或离心管
4. 酶标仪

样品的准备

1. 培养细胞上清：贴壁细胞直接取细胞培养基分析即可；悬浮细胞 300×g 离心除去沉淀，取上清分析。
2. 血浆：采用 EDTA、柠檬酸盐或肝素抗凝，抽血后 30 分钟内 1000×g 离心取上清。
3. 血清：用干净试管或离心管收集血液，室温凝固 1 小时，2000×g 离心取上清。
4. 标本立即分析或-20℃及以下温度保存。

试剂的准备

1. 人 TNF- α 标准品(Human TNF- α Standard)配制：在使用前 10 分钟配制，加入 1ml 样品稀释液 (Sample Diluent Solution) 到标准品管中，将 TNF- α 标准品配制为 10ng/ml，然后吸取部分标准品依次将标准品稀释为 1000pg/ml、500pg/ml、250pg/ml、125pg/ml、62.5pg/ml、31.2pg/ml、15.6pg/ml。剩余 10ng/ml 标准品请-20℃保存。
2. 生物素标记的人 TNF- α 检测抗体 (Human TNF- α Detection Antibody) 工作液配制：在使用前 10 分钟配制，利用检测抗体稀释液 (Detection Antibody Diluent Solution) 将生物素标记的人 TNF- α 检测抗体稀释 100 倍。
3. 辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素 (HRP-Streptavidin) 工作液配制：在使用前 10 分钟配制，利用辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素稀释液(HRP-Streptavidin Diluent Solution) 将辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素稀释 100 倍。
4. 洗涤液(Wash Buffer)的工作液配制：利用去离子水将洗涤液稀释 20 倍。

测定方法

1. 取出酶标板 (Human TNF- α Capture Antibody Coated Plate)，设置空白调零孔、标准曲线孔和样品孔。
2. 在空白调零孔中加入样品稀释液，在标准曲线孔中加入系列浓度标准品，在样品孔中加入正确稀释后的样品，体积均为 100 μ l；37℃孵育 1 小时。
3. 各孔加入 300 μ l 洗涤液清洗酶标板，然后利用吸水纸吸干或甩干，重复 3 次。
4. 各孔加入 100 μ l 生物素标记检测抗体工作液，37℃孵育 1 小时。

5. 各孔加入 300 μ l 洗涤液清洗酶标板，然后利用吸水纸吸干或甩干，重复 3 次。
6. 各孔加入 100 μ l 辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素工作液，37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。
7. 各孔加入 300 μ l 洗涤液清洗酶标板，然后利用吸水纸吸干或甩干，重复 4 次。
8. 各孔加入 100 μ l TMB 反应液(TMB Solution)，37 $^{\circ}$ C 孵育 10-20 分钟。
9. 各孔加入 100 μ l 的终止液(Stop Solution)终止反应。
10. 酶标仪测定 450nm 波长的吸光度。

数据处理

利用标准品浓度为横坐标，OD 值为纵坐标制作标准曲线，并获得横纵坐标之间的函数关系式。然后利用各样品的 OD 值计算样品的 TNF- α 浓度。

注意事项

1. 用户在初次使用试剂盒时，应将小体积试剂离心数分钟，以便试剂集中到管底。
2. 要严格避免操作过程中酶标板干燥，干燥会使酶标板上生物成份失活和下一步非特异反应强度加大。
3. 使用前 TMB 显色液为无色透明溶液，若发现颜色异常，请及时与厂家联系。
4. 为避免交叉污染，请勿重复使用移液器吸头。
5. 禁止混用不同批次试剂盒内的试剂和酶标板。
6. 每次实验剩余的酶标板条，应压紧铝箔袋密封条密封保存。
7. 测定未知 TNF- α 浓度范围样品时，应先利用少量酶标板条和加入不同稀释倍数样品及 1000pg/ml 标准品来评估样品 TNF- α 浓度范围，然后再进行批量测定正确稀释后的样品。
8. 本试剂盒仅用于科学研究，不得用于诊断和医疗。