



## 人肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) 酶联免疫分析

### 试剂盒使用说明书

本试剂盒仅供研究使用。

#### 检测范围:

20 ng/L -400 ng/L

**48T / 96T**

#### 使用目的:

本试剂盒用于测定人血清、血浆及相关液体样本中肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 含量。

#### 实验原理

本试剂盒应用双抗体夹心法测定标本中人肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 水平。用纯化的人肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 抗体包被微孔板, 制成固相抗体, 往包被单抗的微孔中依次加入肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), 再与 HRP 标记的肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 抗体结合, 形成抗体-抗原-酶标抗体复合物, 经过彻底洗涤后加底物 TMB 显色。TMB 在 HRP 酶的催化下转化成蓝色, 并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度 (OD 值), 通过标准曲线计算样品中人肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 浓度。

#### 试剂盒组成

试剂盒组成	48 孔配置	96 孔配置	保存
说明书	1 份	1 份	
封板膜	2 片 (48)	2 片 (96)	
密封袋	1 个	1 个	
酶标包被板	1×48	1×96	2-8℃ 保存
标准品: 800ng/L	0.5ml×1 瓶	0.5ml×1 瓶	2-8℃ 保存
标准品稀释液	1.5ml×1 瓶	1.5ml×1 瓶	2-8℃ 保存
酶标试剂	3 ml×1 瓶	6 ml×1 瓶	2-8℃ 保存
样品稀释液	3 ml×1 瓶	6 ml×1 瓶	2-8℃ 保存
显色剂 A 液	3 ml×1 瓶	6 ml×1 瓶	2-8℃ 保存
显色剂 B 液	3 ml×1 瓶	6 ml×1 瓶	2-8℃ 保存
终止液	3ml×1 瓶	6ml×1 瓶	2-8℃ 保存
浓缩洗涤液	(20ml×20 倍) ×1 瓶	(20ml×30 倍) ×1 瓶	2-8℃ 保存

#### 样本处理及要求:

1. 血清: 室温血液自然凝固 10-20 分钟, 离心 20 分钟左右 (2000-3000 转/分)。仔细收集上清, 保存过程中如出现沉淀, 应再次离心。
2. 血浆: 应根据标本的要求选择 EDTA 或柠檬酸钠作为抗凝剂, 混合 10-20 分钟后, 离心 20 分钟左右 (2000-3000 转/分)。仔细收集上清, 保存过程中如有沉淀形成, 应该再次离心。

3. 尿液：用无菌管收集，离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分）。仔细收集上清，保存过程中如有沉淀形成，应再次离心。胸腹水、脑脊液参照实行。
4. 细胞培养上清：检测分泌性的成份时，用无菌管收集。离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分）。仔细收集上清。检测细胞内的成份时，用 PBS（PH7.2-7.4）稀释细胞悬液，细胞浓度达到 100 万/ml 左右。通过反复冻融，以使细胞破坏并放出细胞内成份。离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分）。仔细收集上清。保存过程中如有沉淀形成，应再次离心。
5. 组织标本：切割标本后，称取重量。加入一定量的 PBS，PH7.4。用液氮迅速冷冻保存备用。标本融化后仍然保持 2-8℃ 的温度。加入一定量的 PBS（PH7.4），用手工或匀浆器将标本匀浆充分。离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分）。仔细收集上清。分装后一份待检测，其余冷冻备用。
6. 标本采集后尽早进行提取，提取按相关文献进行，提取后应尽快进行实验。若不能马上进行试验，可将标本放于 -20℃ 保存，但应避免反复冻融
7. 不能检测含 NaN<sub>3</sub> 的样品，因 NaN<sub>3</sub> 抑制辣根过氧化物酶的（HRP）活性。

#### 操作步骤：

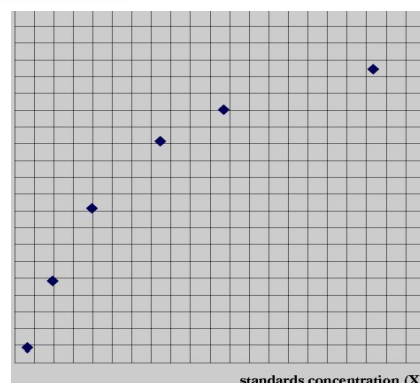
- 1、标准品的稀释：本试剂盒提供原倍标准品一支，用户可按照下列图表在小试管中进行稀释。

400ng/L	5 号标准品	150μl 的原倍标准品加入 150μl 标准品稀释液
200ng/L	4 号标准品	150μl 的 5 号标准品加入 150μl 标准品稀释液
100ng/L	3 号标准品	150μl 的 4 号标准品加入 150μl 标准品稀释液
50ng/L	2 号标准品	150μl 的 3 号标准品加入 150μl 标准品稀释液
25ng/L	1 号标准品	150μl 的 2 号标准品加入 150μl 标准品稀释液

- 2、加样：分别设空白孔（空白对照孔不加样品及酶标试剂，其余各步操作相同）、标准孔、待测样品孔。在酶标包被板上标准品准确加样 50μl，待测样品孔中先加样品稀释液 40μl，然后再加待测样品 10μl（样品最终稀释度为 5 倍）。加样将样品加于酶标板孔底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀。
- 3、温育：用封板膜封板后置 37℃ 温育 30 分钟。
- 4、配液：将 30 倍（48T 的 20 倍）浓缩洗涤液用蒸馏水 30 倍（48T 的 20 倍）稀释后备用
- 5、洗涤：小心揭掉封板膜，弃去液体，甩干，每孔加满洗涤液，静置 30 秒后弃去，如此重复 5 次，拍干。
- 6、加酶：每孔加入酶标试剂 50μl，空白孔除外。
- 7、温育：操作同 3。
- 8、洗涤：操作同 5。
- 9、显色：每孔先加入显色剂 A 50μl，再加入显色剂 B 50μl，轻轻震荡混匀，37℃ 避光显色 10 分钟。
- 10、终止：每孔加终止液 50μl，终止反应（此时蓝色立转黄色）。
- 11、测定：以空白孔调零，450nm 波长依序测量各孔的吸光度（OD 值）。测定应在加终止液后 15 分钟以内进行。

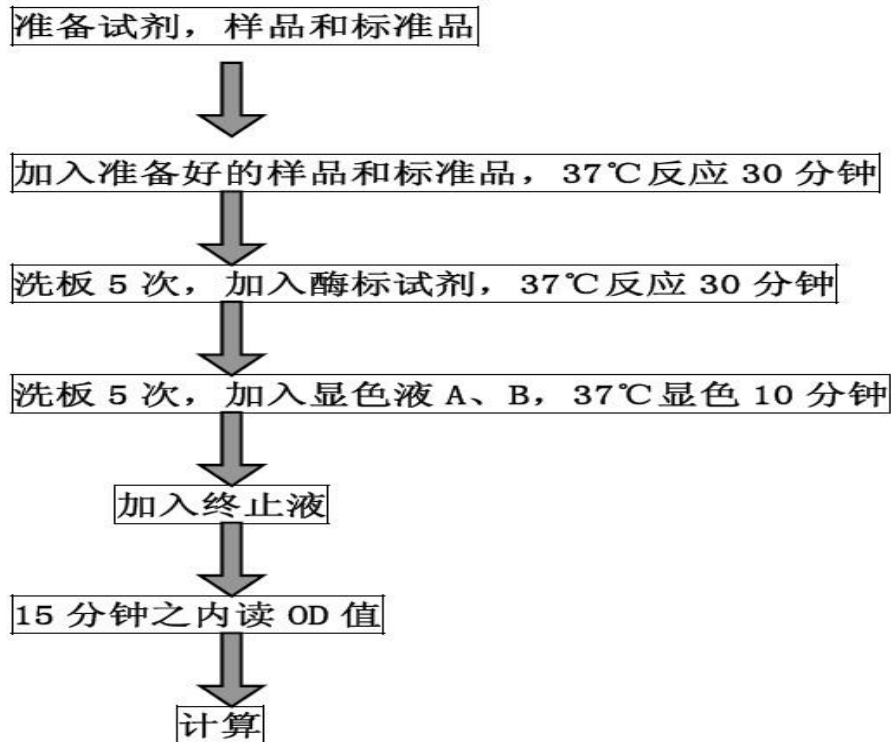
#### 计算：

以标准物的浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，在坐标纸上绘出标准曲线，根据样品的 OD 值由标准曲线查出相应的浓度；再乘以稀释倍数；或用标准物的浓度与 OD 值计算出标准曲线的直线回归方程式，将样品的 OD 值代入方程式，计算出样品浓度，再乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。



(此图仅供参考)

#### 操作程序总结:



#### 注意事项

1. 试剂盒从冷藏环境中取出应在室温平衡 15-30 分钟后方可使用, 酶标包被板开封后如未用完, 板条应装入密封袋中保存。
2. 浓洗涤液可能会有结晶析出, 稀释时可在水浴中加温助溶, 洗涤时不影响结果。
3. 各步加样均应使用加样器, 并经常校对其准确性, 以避免试验误差。一次加样时间最好控制在 5 分钟内, 如标本数量多, 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。如标本中待测物质含量过高 (样本 OD 值大于标准品孔第一孔的 OD 值), 请先用样品稀释液稀释一定倍数 (n 倍) 后再测定, 计算时请最后乘以总稀释倍数 ( $\times n \times 5$ )。
5. 封板膜只限一次性使用, 以避免交叉污染。
6. 底物请避光保存。
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。
8. 所有样品, 洗涤液和各种废弃物都应按传染物处理。
9. 本试剂不同批号组分不得混用。

#### 保存条件及有效期:

1. 试剂盒保存: 2-8°C
2. 有效期: 6 个月

#### 试剂盒性能:

1. 样品线性回归与预期浓度相关系数 R 值为 0.990 以上。
2. 批内与批间应分别小于 9% 和 11%

武汉赛培生物, 高品质 ELISA 试剂盒供应商, 现货供应, 厂家直销, 价格实惠, 售后完善, 提供免费代测服务, 含税含运费, (ELISA 检测试剂盒价格) 欢迎您来电索取。

武汉赛培生物科技有限公司

官网: [www.spbio.cn](http://www.spbio.cn) 电话: 027-87639600

QQ: 16558017