

猪 α 肿瘤坏死因子(TNF- α)酶联免疫吸附测定试剂盒

Porcine TNF- α ELISA Kit

本产品冰袋运输; 保存于4°C(其中**标准品**需保存于-20°C), 保质期6个月; **标准品**如存放于4°C, 1~2周内有效。

货号规格

HJ229 96次

产品特点

- 高灵敏度**——多次重复结果表明, 最小检出量为26.8 pg/mL;
- 高特异性**——与小鼠、大鼠 TNF- α 以及人 TNF- β 均无交叉反应, 与人 TNF- α 有6.3%的交叉反应性;
- 重复性好**——板内, 板间变异系数均小于10%。

产品简介

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法检测样品中猪 α 肿瘤坏死因子(TNF- α)的浓度。猪 TNF- α 捕获抗体已经预包被于酶标板上, 当加入样品或标准品时, 其中的猪 TNF- α 会与捕获抗体结合, 而其它游离成分则会通过洗涤被除去。接着, 再加入生物素化的抗猪 TNF- α 抗体后, 抗猪 TNF- α 抗体与猪 TNF- α 接合, 形成夹心的免疫复合物, 其它游离成分则通过洗涤被除去。随后加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的亲合素, 生物素与亲合素特异性结合, 这样亲合素上标记的 HRP 就与夹心的免疫复合物连接起来, 而其它游离成分则通过洗涤被除去。最后加入显色剂, 若样品中存在猪 TNF- α , 则会形成免疫复合物, 其上连接的 HRP 会催化无色的显色剂氧化生成蓝色物质, 而后加入终止液, 最终产物呈黄色。通过酶标仪检测, 读其450 nm处的OD值, 猪 TNF- α 浓度与OD450值之间呈正比, 通过检测标准品绘制标准曲线, 对照未知样品中OD值, 即可计算出样品中猪 TNF- α 浓度。

背景简介

肿瘤坏死因子(TNF- α)是由单核细胞和巨噬细胞产生的多肽类细胞因子, 在炎症反应、免疫系统的发展、细胞程序性死亡和脂代谢中发挥着重要的作用。在免疫反应中, TNF- α 通常扮演着一个多功能的调节器角色, 甚至可以作为一个强烈的热原性物质刺激中性粒细胞, 改变血管内皮细胞的特性, 调节其它组织的代谢活性。TNF- α 也可通过抑制脂蛋白脂肪酶的活性而导致恶液病, 爱泼斯坦病毒引起的细胞活化也可被 TNF- α 所抑制。

巨噬细胞表面的淋巴因子和肉毒素可介导上皮细胞、内皮细胞和肿瘤细胞等产生 TNF- α , 据报道干扰素也能显著提高 TNF- α 的分泌量。TNF- α 在关节炎和其它组织炎症的发病机理中发挥着重要的作用, 此外它还参与了包括哮喘、克罗恩氏病、类风湿性关节炎、神经性疼痛、肥胖症、II型糖尿病、自身免疫病和肿瘤等疾病的发生。

产品内容

组分	体积或数量
猪TNF- α 预包被板	12条
样品分析缓冲液	5 mL
标准品稀释液(5 \times)	10 mL
猪TNF- α 标准品	≥ 2 支(冻干)
猪TNF- α 生物素化抗体	10 mL
HRP标记的亲合素	10 mL
浓缩洗涤液(20 \times)	30 mL
显色剂TMB	10 mL
终止液	5 mL
封板胶纸	3张

操作步骤

◆ 样品制备

1. 根据样品种类选择相应的处理方法：
 - A. 细胞上清：将细胞培养上清液 100~500×g 离心 5 min，去除悬浮物后即可；
 - B. 血清样品：将全血在室温下静置 0.5~2h，待其自然凝固并析出血清后，离心取黄色上清即可（4℃，1,000~2,000×g，10 min），注意请勿吸取沉淀，制备好的血清需置于冰上待用，请勿在其中添加任何防腐剂或抗凝剂；
 - C. 血浆样品：使用 EDTA 对全血进行抗凝处理后，混合均匀置于冰上，离心取黄色上清即可（4℃，1,000~2,000×g，10 min），注意请勿吸取沉淀，制备好的血浆需置于冰上待用；

注意：① 猪血清或血浆样品请用 **样品分析缓冲液** 做倍比稀释后再检测；

② 若待测样品无法及时检测，样品制备完成后，请分装冻存于-20℃，避免反复冻融；

③ 请保证待测样品清澈透明，检测前如发现样品中有悬浮物，需通过离心去除；

④ 为了保证检测结果准确，请勿使用溶血、黄疸、高血脂或污染的样品。

◆ 检测准备工作

2. 试剂盒自冰箱取出后，请置于室温平衡 20 min；检测完成后，剩余试剂请及时置于 4℃ 保存；
3. 将 **浓缩洗涤液 (20×)** 用双蒸水或去离子水稀释为 1× 洗涤液；
4. 将 **标准品稀释液 (5×)** 用双蒸水或去离子水稀释为 1× 标准品稀释液；
5. 按标准品标签上注明的复溶体积，用 1× 标准品稀释液复溶使标准品终浓度达到 2,000 pg/mL，室温操作，**请严格控制在 25~28℃**，静置 15~20 min 后轻轻混悬，用移液器吹打数次，使其彻底溶解，然后按下表用 1× 标准品稀释液倍比梯度稀释后依次加入检测孔中。（最高浓度为 2,000 pg/mL，将 1× 标准品稀释液作为浓度 0 pg/mL。）

管号	稀释液用量 (μL)	复溶后标准品用量 (μL)	标准品的最终浓度 (pg/mL)
A	0	250	2,000
B	250	250	1,000
C	250	250 (从 B 管中取)	500
D	250	250 (从 C 管中取)	250
E	250	250 (从 D 管中取)	125
F	250	250 (从 E 管中取)	62.5
G	250	0	0

注意：标准品复溶加样后，剩余部份请丢弃。

◆ 检测流程

6. 通过计算确定一次实验所需的板条数，取出所需板条放置于框架内，多余的板条请放回铝箔袋密封，保存于 4℃；

注意：① 标准品和样品建议做双复孔检测；
② 建议设置本底校正孔，即空白孔，只加入相应体积的 **显色剂 TMB** 和 **终止液** 即可；
③ 每次实验均需绘制标准曲线。
7. 将样品和不同浓度标准品 (100 μL/孔) 分别加入相应孔中，用封板胶纸封住反应孔，室温孵育 120 min。细胞上清样品一般可直接进行检测，如超过试剂盒的检测范围，可用 1× 标准品稀释液进行相应稀释；对于血清或血浆样品，可先在孔中加入 50 μL **样品分析缓冲液**，接着加入 50 μL 样品，如超出

检测范围，可先加入 50 μ L 样品分析缓冲液，接着加入 50 μ L 用 1 \times 标准品稀释液稀释后的样品，再进行检测，请注意记录好样品的稀释倍数；

注意：① 请查阅相关文献确定样品中待检测蛋白的大致浓度，若其大于或小于本试剂盒的最高或最低标准品浓度，请将样品适当稀释或浓缩后再进行检测；

② 整个加样过程不宜超过 10 min，否则可能会影响检测结果。

8. 洗板 5 次，每孔 1 \times 洗涤液用量为 300 μ L，注入与吸出间隔 15~30 s，洗完后将板倒扣在厚吸水纸上拍干；

注意：洗涤过程至关重要，洗涤不充分会导致结果产生较大误差。

9. 加入 猪 TNF- α 生物素化抗体 (100 μ L/孔，无需稀释)。用封板胶纸封住反应孔，室温孵育 60 min；

注意：检测血清和血浆样品时，检测抗体的孵育时间应适当延长。

10. 洗板 5 次，方法同步骤 8；

11. 加入 HRP 标记的亲合素 (100 μ L/孔，无需稀释)。用封板胶纸封住反应孔，避光室温孵育 20 min；

12. 洗板 5 次，方法同步骤 8；

13. 加入 显色剂 TMB (100 μ L/孔)，避光室温孵育 10~20 min；

注意：在保存和使用时，请勿将 TMB 接触氧化剂和金属。

14. 加入 终止液 (50 μ L/孔)，混匀后即刻使用酶标仪测量 OD450，同时设定 540 nm 或 570 nm 作为校正波长，即可计算得到校正吸光度值 (OD450-OD540 或 OD450-OD570)；

注意：读取 OD 值建议在 10 min 内完成。

◆ 数据分析

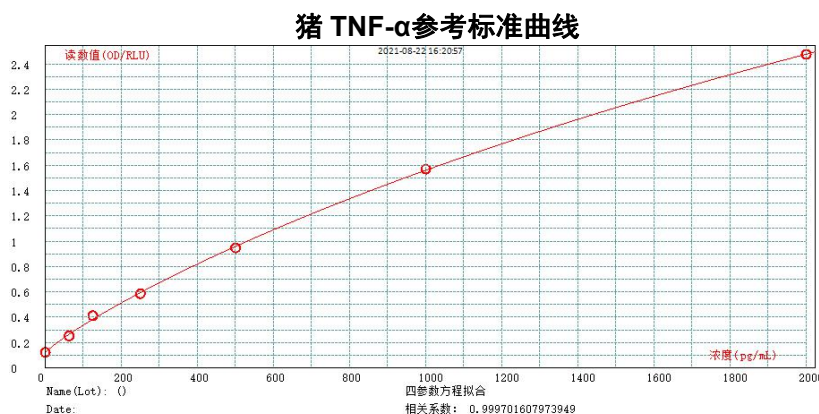
15. 绘制标准曲线。以标准品浓度作横坐标，OD 值作纵坐标，利用计算机软件作四参数逻辑 (4-PL) 曲线拟合创建标准曲线，通过样品的 OD 值即可在标准曲线上计算出其相应浓度。

注意：① 复孔 OD 值在 20% 的差异范围内结果才有效，复孔 OD 值取平均后可作为测量值；

② 每个标准品或样品的 OD 值应减去本底校正孔的 OD 值；

③ 若样品 OD 值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测，计算浓度时应乘以稀释倍数。

◆ 标准曲线范例



注意：本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线计算样品含量。

注意事项

1. 浓缩洗涤液 低温情况下可能会出现结晶，请水浴加热使结晶完全溶解后再配制工作液；
2. 严禁混用不同批号试剂盒的组分；
3. 加样过程请避免产生气泡，实验操作过程中一定要保证试剂充分混匀，否则会使结果产生较大误差；
4. 说明书中提到的室温条件，请严格控制在 25~28 $^{\circ}$ C；
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；
6. 本产品仅限科研使用。

版本号: 21L02