

# 达优

## Human TNF- $\alpha$ Precoated ELISA Kit

Cat#: 1117202/1117203

### ELISA 试剂盒 说明书

本试剂盒仅供科研使用，请勿用于诊断  
使用前请仔细阅读说明书并检查试剂盒组分

# Human TNF- $\alpha$

## Precoated ELISA Kit

Cat#:1117202

Cat#:1117203

ELISA 试剂盒

### 检测原理

达优 ELISA 试剂盒采用双抗体夹心酶联免疫吸附检测技术。特异性的抗体包被到酶标板上，标准品或样本加入孔中，样本中含有的目标物质被固定化的抗体捕获，加入检测抗体，形成抗体-抗原-抗体的复合体，加入酶和底物，在酶的催化下底物发生反应，且反应的颜色与目标物质的含量成正比，加入终止液后，在酶标仪中测定反应的吸光值。

### 预期用途

定量检测血清、血浆、缓冲液或细胞培养液中的 TNF- $\alpha$ 含量。

### 知识背景

TNF- $\alpha$ 是一种单核因子，主要由单核细胞和巨噬细胞产生。IFN- $\gamma$ 、M-CSF、GM-CSF 对单核细胞/巨噬细胞产生 TNF- $\alpha$ 有刺激作用，而 PGE 则有抑制作用。TNF- $\alpha$ 在关节组织和其它组织发生炎症的发病机制具有重要作用。最近，越来越多的信息表明 TNF- $\alpha$ 也参与了 A-I-D-S 的发病机制。

### 保存条件

未开封试剂盒在 2°C~8°C可稳定保存 12 个月。

开封后各组分保存条件见下：

**Cat#:1117202**

组分	规格	数量	保存条件
<b>Cytokine Standard</b>	48 T	2 瓶	复溶后-25°C~-15°C保存 15 天，分装保存，不可重复冻融。
<b>Biotinylated Antibody</b>	50 μL	2 管	原液 2°C~8°C可稳定保存 1 个月，稀释后不可保存。
<b>Streptavidin-HRP</b>	50 μL	2 管	原液 2°C~8°C可稳定保存 1 个月，稀释后不可保存。
<b>Dilution Buffer R (1×)</b>	10 mL	3 瓶	2°C~8°C可稳定保存 1 个月。
<b>Washing Buffer (50×)</b>	15 mL	1 瓶	原液 2°C~8°C可稳定保存 1 个月，稀释后不可保存。
<b>TMB</b>	10 mL	1 瓶	2°C~8°C可稳定保存 1 个月。
<b>Stop Solution</b>	10 mL	1 瓶	2°C~8°C可稳定保存 1 个月。
<b>Precoated ELISA plate</b>	96 T	1 块	2°C~8°C可稳定保存 1 个月，密封保存。
<b>封板膜</b>	/	4 张	/
<b>说明书</b>	/	1 份	/

## Cat#:1117203

组分	规格	数量	保存条件
<b>Cytokine Standard</b>	48 T	10 瓶	复溶后-25℃~-15℃保存 15 天, 分装保存, 不可重复冻融。
<b>Biotinylated Antibody</b>	50 μL	10 管	原液 2℃~8℃可稳定保存 1 个月, 稀释后不可保存。
<b>Streptavidin-HRP</b>	500 μL	1 管	原液 2℃~8℃可稳定保存 1 个月, 稀释后不可保存。
<b>Dilution Buffer R (10×)</b>	18 mL	1 瓶	2℃~8℃可稳定保存 1 个月。
<b>Washing Buffer (50×)</b>	75 mL	1 瓶	原液 2℃~8℃可稳定保存 1 个月, 稀释后不可保存。
<b>TMB</b>	50 mL	1 瓶	2℃~8℃可稳定保存 1 个月。
<b>Stop Solution</b>	50 mL	1 瓶	2℃~8℃可稳定保存 1 个月。
<b>Precoated ELISA plate</b>	96 T	5 块	2℃~8℃可稳定保存 1 个月, 密封保存。
<b>封板膜</b>	/	20 张	/
<b>说明书</b>	/	1 份	/

## | 需自备的材料设备

- + 能够检测 450 nm 和 630 nm 吸光度的酶标仪
- + 微量加液器及枪头、加样槽
- + 蒸馏水或去离子水
- + 旋涡振荡器或磁力搅拌器

## | 注意事项

1. 试剂按标签和说明书储存，使用前平衡至室温。
2. 标准品按照标签溶解，充分混匀，按照一次使用量分装保存。
3. 预包被板条使用前平衡至室温；剩余板条及时密封保存。
4. Washing Buffer (50x) 在 2°C~8°C 保存可能有结晶析出，若有析出加热或平衡温度使其溶解后再使用。
5. 离心管试剂体积量较小，使用前高速短暂离心收集试剂到管底。
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；试剂稀释及加样时注意混匀试剂。
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. 使用干净的容器配制试剂。
10. 洗涤后孔中残留的洗涤液应在吸水纸上充分拍干，直至吸水纸上看不到水印。请勿直接将孔中的洗涤液吸干。
11. TMB 对光和金属敏感，避免长时间暴露于光下，避免与金属接触。未使用的 TMB 若变为蓝色，表明 TMB 已经污染，请丢弃。
12. 请严格按照说明书建议的反应时间和温度进行孵育。冬季室内温度偏低，建议使用恒温箱或培养箱孵育。
13. 请在保质期内使用试剂盒，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- $\alpha$  的样本应稀释后重新测试。在结果分析时，结合考虑相应的稀释度。

15. **安全提示：**使用本试剂盒时请做好合适的防护措施，如穿戴白大褂、乳胶手套、安全眼镜等；避免试剂接触皮肤和眼睛，如不慎接触，立即用大量清水清洗。

16. **废弃处置：**终止液使用碱性溶液中和或稀释后，再用大量水冲入废水系统。其他成分按一般废弃物处理方法和当地相关法规的要求进行处理。

## | 样本处理说明

新鲜标本尽早检测，对收集后当天就进行检测的标本，及时储存 2°C~8°C。如有特殊原因需要周期性收集标本，请在取材后，将标本及时分装并放在 -25°C~-15°C 或更低温度条件下保存，避免反复冻融。

+ **血清\*：**室温血液自然凝固 10~20 分钟后，离心 20 分钟（2000~3000 转/分），仔细收集上清。保存过程中如有沉淀形成，应再次离心取上清。

+ **血浆\*：**应根据标本的要求选择 EDTA、柠檬酸钠或肝素作为抗凝剂，混合 10~20 分钟后，离心 20 分钟（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。

+ **细胞培养上清：**检测分泌性的成份时，请用无菌管收集细胞培养悬液，离心 20 分钟（2000~3000 转/分），仔细收集上清。检测细胞内的成份时，用 1×PBS (pH 7.2~7.4) 将细胞悬液稀释至  $10^6$  cell/mL 左右，反复冻融，以使细胞破碎释放细胞内成份，离心 20 分钟（2000~3000 转/分），仔细收集上清。细胞培养上清保存过程中如有沉淀形成，应再次离心。

\*血浆血清样本检测之前需用 Dilution Buffer R (1×)至少稀释 2 倍后检测，以降低样本基质效应。具体稀释倍数需预实验确定。

## 试剂的配制

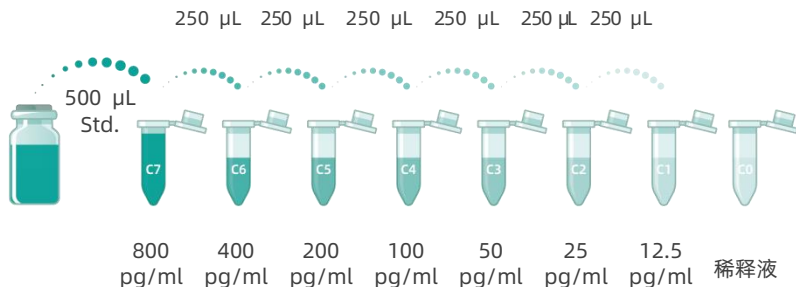
1. 提前 20 分钟将 Washing Buffer(50 $\times$ )和即用溶液从试剂盒中取出，平衡至室温。

2. 需稀释配制成工作液的试剂现配现用。

3. **Cytokine Standard**: 先按标签说明将冻干粉溶解，溶解后的浓度为 800 pg/mL，再用 1 $\times$ Dilution Buffer R (1 $\times$ )进行倍比稀释。稀释前将标准品轻轻振荡 5 分钟。

+ **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、12.5 pg/mL，为确保标准品稀释的准确性，建议在实验孔外进行标准品的倍比稀释。

+ **稀释步骤**: 校准品按瓶标签进行溶解后移入 EP 管中，标记为 C7。再取 6 个 EP 管，分别标记为 C6/C5/C4/C3/C2/C1，每个管中加 250  $\mu$ L 稀释液，从 C7 中取出 250  $\mu$ L 高浓度校准品至 C6 管中进行 2 倍倍比稀释，以同样方式稀释 C5/C4/C3/C2/C1 管中，以稀释液作为 C0。



4. **Biotinylated Antibody:** 1:50 用 Dilution Buffer R (1×) 稀释, 混匀制成 Biotinylated Antibody 工作液。

5. **Streptavidin-HRP:** 1:100 用 Dilution Buffer R (1×) 稀释, 混匀制成 Streptavidin-HRP 工作液。

6. **Washing Buffer (50×):** 1:50 用蒸馏水稀释。

7. **\*Dilution Buffer R (10×):** 1:9 用 1×PBS (pH=7.2~7.4) 配制成 1×Dilution Buffer R 工作液, 只用于稀释 Cytokine Standard、Biotinylated Antibody、Streptavidin-HRP 和样品

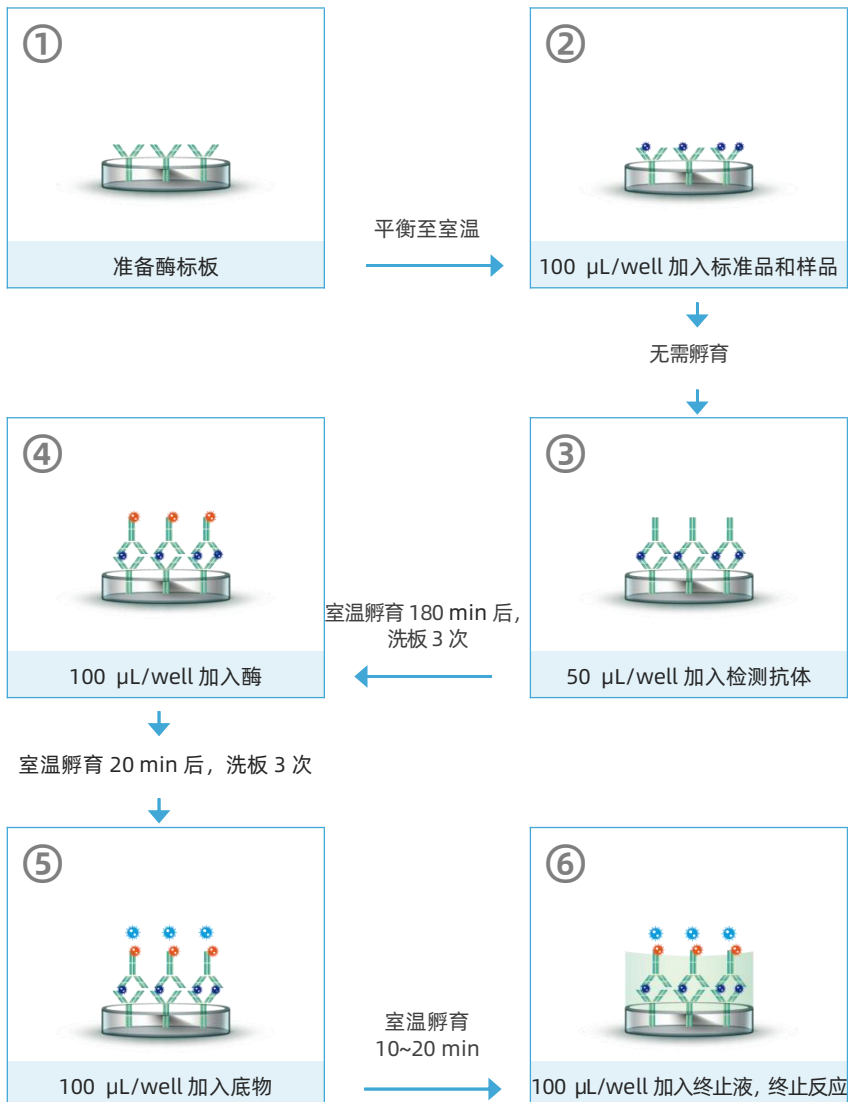
\*此步骤适用于 Cat#:1117203 试剂盒, Cat#:1117202 中本试剂为 1×工作液, 无需稀释。

## | 即用型试剂

- + **Dilution Buffer R (1×):** 用于稀释 Cytokine Standard、样本、Biotinylated Antibody 和 Streptavidin-HRP。
- + **TMB**
- + **Stop Solution**



## 操作过程简图



## | 操作过程

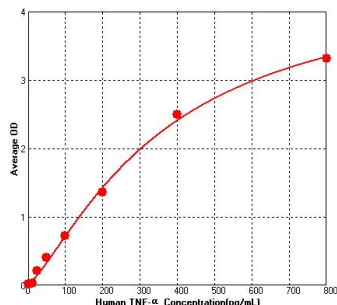
1. 使用前，将所有试剂充分混匀，避免产生泡沫。
2. 根据实验孔（空白和标准品）数量，确定所需的板条数目。样本（含标准品）和空白都应做复孔。
3. **加样：**100  $\mu\text{L}/\text{well}$  加入稀释后的 Cytokine Standard 至标准品孔，100  $\mu\text{L}/\text{well}$  加入样本至样本孔，100  $\mu\text{L}/\text{well}$  加入 Dilution Buffer R (1 $\times$ )至空白对照孔。
4. **加检测抗体：**50  $\mu\text{L}/\text{well}$  加入 Biotinylated Antibody 工作液。混匀后盖上封板膜，室温（18 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$ ）孵育 180 分钟。
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 $^{\circ}\text{C}$ ~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 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$ ）避光孵育 10~20 分钟。可根据孔内颜色的深浅判断，校准曲线最高值孔为深蓝色，空白孔无明显蓝色时即可终止反应。
9. **终止反应：**100  $\mu\text{L}/\text{well}$  迅速加入 Stop Solution 终止反应。
10. **读板：**终止反应 10 分钟内在酶标仪进行双波长读板，设置检测波长 450 nm 和参考波长 610 nm~630 nm；校正后的 OD 值为检测波长的测定值减去参考波长的测定值。

## 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；若样品浓度高于最高线性值，需稀释样本并重新测定。

Human TNF- $\alpha$ Concentration (pg/mL)	OD		Average OD
800	3.368	3.261	3.3145
400	2.531	2.447	2.489
200	1.365	1.343	1.354
100	0.693	0.759	0.726
50	0.396	0.403	0.3995
25	0.219	0.21	0.2145
12.5	0.018	0.044	0.031
0	0.011	0.014	0.0125



3. 示例数据仅供参考，每次实验必须制备当次实验的标准曲线。

## 性能数据

1. **灵敏度**: 8 pg/mL, 10 个空白样本的对应浓度平均值加上三倍标准偏差。

2. **精密度**: 板内精密度: 3 个已知浓度的样本板内重复测定 10 次, 计算得到板内变异系数; 板间精密度: 3 个已知浓度的样本板间分别重复测定 3 次, 计算得到板间变异系数

样本	板内精密度			板间精密度		
	1	2	3	1	2	3
测试次数	10	10	10	9	9	9
标准差	1.87	4.97	6.37	2.51	6.11	9.35
平均值(pg/mL)	32.41	102.38	430.66	32.72	102.14	426.77
变异系数 CV (%)	5.76	4.85	1.48	7.67	5.98	2.19

3. **回收率**: 健康人样本中加入 3 个不同已知浓度的 TNF- $\alpha$ , 每个水平重复测定 10 次, 未加入的样本作为本底, 计算添加回收率。

样本类型	平均回收率 (%)	回收率范围 (%)
血清	93.72	89.19~97.48
血浆	95.76	90.18~104.84

4. **稀释线性**: 健康人样本中加入高浓度 TNF- $\alpha$ , 在线性范围内进行倍比稀释, 评估检测线性。

组分		1:2	1:4	1:8
血清	平均值 (%)	100.38	86.29	90.04
	范围 (%)	95~107	83~89	88~95
血浆	平均值 (%)	91.16	83.00	86.15
	范围 (%)	88~96	83~86	82~92

5. **校准:** 试剂盒校准品为达优校准的高纯度重组 TNF- $\alpha$ 。

6. **特异性:** 本试剂盒可识别人天然和重组 TNF- $\alpha$ ; 对以下因子进行检测, 未出现明显的交叉反应及干扰影响。

人	小鼠	大鼠
IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	TNF- $\alpha$
IL-2	IL-2	IL-2
IL-4	IL-4	IL-4
IL-6	IL-6	IL-6
IL-10	IL-10	IL-10

## | 参考文献

[1] Wang Keyu , Gong Meiliang , Zhao Sumin , Lai Chengcai , Zhao Lingna , Cheng Sijie , Xia Min , Li Yuru , Wang Kun , Sun Heqiang , Zhu Pingjun , Zhou Yu , Ao Qiangguo , Deng Xinli .A novel lncRNA DFRV plays a dual function in influenza A virus infection[J].Frontiers in Microbiology,14,2023.

[2] Shi, W., Xu, G., Gao, Y.et al.Novel role for epalrestat: protecting against NLRP3 inflammasome-driven NASH by targeting aldose reductase[J].J Transl Med 21, 700 (2023).

[3] Chen J,Shen L,Guo Q, et al.The downregulation of Tapasin in dendritic cell regulates CD8+T cell autophagy to hamper hepatitis B viral clearance in the induced pluripotent stem cell-derived hepatocyte organoid[J].J Med Virol.2024;96:e29546.

[4] Chen, T., Deng, J., Zhang, Y.et al.The construction of modular universal chimeric antigen receptor T (MU-CAR-T) cells by covalent linkage of allogeneic T cells and various antibody fragments[J].Mol Cancer 23, 53 (2024).

[5] Lin, K., Xia, B., Wang, X.et al.Development of nanobodies targeting hepatocellular carcinoma and application of nanobody-based CAR-T technology[J].J Transl Med 22, 349 (2024).

[6] Yang, C., Wang, X., To, K.K.W.et al.Circulating tumor cells shielded with extracellular vesicle-derived CD45 evade T cell attack to enable metastasis[J].Sig Transduct Target Ther 9, 84 (2024).

## | 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
<b>非常弱的结果</b>	温育的时间或温度不够； 显色反应时间太短； 试剂配制不准确，浓度低； 酶标仪滤光片不正确； 不正确的试剂储存方式； 试剂盒没有充分平衡； 移液枪吸量不准确。	✓ 校正孵育温度； ✓ 严格按照反应时间孵育； ✓ 按照说明书保存试剂盒、控制孵育时间、准确配制工作液及平衡试剂； ✓ 校正移液枪。
<b>标准曲线和复孔重复性差</b>	加样本及试剂量不准；孔间不一致； 加样过快，孔间发生污染； 加错样本； 不同批号试剂盒中组分混用； 试剂/样本没有混匀； 生物样本异常。	✓ 复孔加样的加样时间尽量保持一致； ✓ 重复测定样本，操作条件、人员等应尽可能与上次保持一致； ✓ 样本稀释前应充分混匀； ✓ 生物样本保持新鲜，无异常。
<b>阳性对照不显色</b>	洗液配制异常，如量筒不干净等； 添加的试剂错误或者漏加； 使用试剂过期。	✓ 请按说明书配制试剂； ✓ 注意不要漏加试剂； ✓ 加液前核对标签，保证试剂无误。
<b>高背景</b>	洗板不干净； 试剂配制不准确； 蒸馏水受酶等污染； 孵育温度异常或反应时间过长。 不同批号试剂盒中组分混用； 使用过期试剂	✓ 充分洗涤，彻底拍干； ✓ 拍板的滤纸避免反复使用； ✓ 使用新鲜蒸馏水； ✓ 不同批号试剂勿混用； ✓ 请按说明书配制试剂； ✓ 控制适当的显色反应时间。

至臻品质 · 至善服务

**北京行健雅生物技术有限公司**（该产品由深圳市达科为生物工程有限公司监制）

**网址：**[www.dakewe.com](http://www.dakewe.com)

**电话：**010-57794997

**邮箱：**[xing\\_jianya@dakewe.net](mailto:xing_jianya@dakewe.net)

**地址：**北京市大兴区中关村科技园区大兴生物医药产业基地华佗路 50 号院 1 号楼 301