

达优

Mouse TNF- α Precoated ELISA Kit

Cat#: 1217202/1217203

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

Mouse TNF- α

Precoated ELISA Kit

ELISA 试剂盒

Cat#:1217202

Cat#:1217203

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- α 含量。

知识背景

肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor α , TNF- α) 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，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。

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#:1217202

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

Cat#:1217203

组分	规格	数量	保存条件
Cytokine Standard	48 T	10 瓶	复溶后-25℃~-15℃保存 15 天, 分装保存, 不可重复冻融。
Biotinylated Antibody	25 μL	10 管	原液 2℃~8℃可稳定保存 1 个月, 稀释后不可保存。
Streptavidin-HRP	500 μL	1 管	原液 2℃~8℃可稳定保存 1 个月, 稀释后不可保存。
Dilution Buffer R (10×)	18 mL	1 瓶	2℃~8℃可稳定保存 1 个月。
Washing Buffer (50×)	75 mL	1 瓶	原液 2℃~8℃可稳定保存 1 个月, 稀释后不可保存。
TMB	50 mL	1 瓶	2℃~8℃可稳定保存 1 个月。
Stop Solution	50 mL	1 瓶	2℃~8℃可稳定保存 1 个月。
Precoated ELISA plate	96 T	5 块	2℃~8℃可稳定保存 1 个月, 密封保存。
封板膜	/	20 张	/
说明书	/	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. 1000 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 1000 pg/mL TNF- α 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

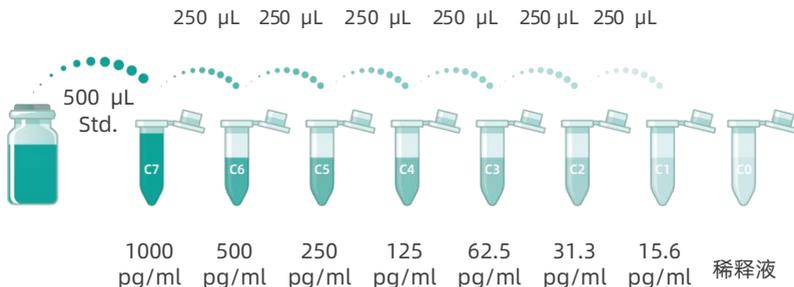
1. 提前 20 分钟将 Washing Buffer(50×)和即用溶液从试剂盒中取出，平衡至室温。

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 1000 pg/mL，再用 1×Dilution Buffer R (1×)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**: 1000 pg/mL、500 pg/mL、250 pg/mL、125 pg/mL、62.5 pg/mL、31.3 pg/mL、15.6 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 μL 稀释液，从 C7 中取出 250 μL 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**: 1:100 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。

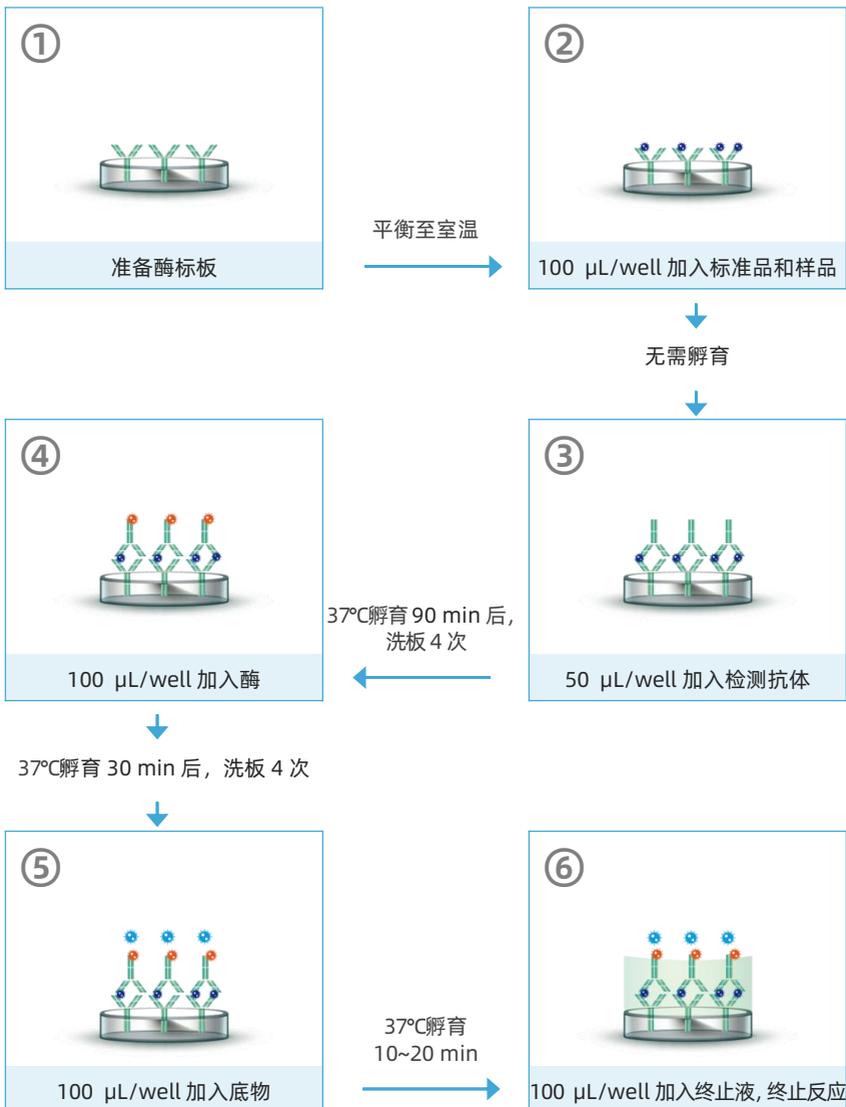
7. ***Dilution Buffer R (10×)**: 1:9 用 1×PBS (pH=7.2~7.4) 配制成 1×Dilution Buffer R 工作液, 只用于稀释 Cytokine Standard、Biotinylated Antibody、Streptavidin-HRP 和样品

[*此步骤适用于 Cat#:1217203 试剂盒, Cat#:1217202 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

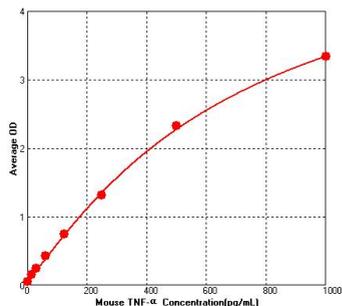
1. 使用前，将所有试剂充分混匀，避免产生泡沫。
2. 根据实验孔（空白和标准品）数量，确定所需的板条数目。样本（含标准品）和空白都应做复孔。
3. **加样：**100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加入稀释后的 Cytokine Standard 至标准品孔，100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加入样本至样本孔，100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加入 Dilution Buffer R (1 \times)至空白对照孔。
4. **加检测抗体：**50 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加入 Biotinylated Antibody 工作液。混匀后盖上封板膜，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 90 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 4 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，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 分钟。
7. **洗板：**重复步骤 5。
8. **显色：**100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加入 TMB，37 $^{\circ}\text{C}$ 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。

Mouse TNF- α Concentration (pg/mL)	OD	Average OD
1000	3.366	3.294
500	2.314	2.324
250	1.31	1.315
125	0.732	0.759
63	0.41	0.434
31	0.24	0.259
16	0.138	0.161
0	0.049	0.051



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	1.95	4.35	25.81	2.07	4.84	32.18
平均值(pg/mL)	31.48	120.79	505.24	31.25	122.13	515.26
变异系数 CV (%)	6.21	3.61	5.11	6.62	3.96	6.25

3. **校准**: 试剂盒校准品为达优校准的高纯度重组 TNF- α 。

| 参考文献

- [1] Shen, Y., Xu, Y., Shen, P. et al. A bifunctional fusion protein protected against diabetic nephropathy by suppressing NLRP3 activation[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2023.
- [2] Jing Huang, Yufei Wang, Kangfeng Wang, Shulei Li, Peng Sun, Yan Guo, Jiankai Liu, Ruifu Yang, Ming Zeng, Chao Pan, Hengliang Wang, Li Zhu. Biosynthesis and Immunological Evaluation of a Dual-Antigen Nanoconjugate Vaccine Against Brucella melitensis[J]. Engineering, 2023.
- [3] Fumei He, Zeqi Liu, Jian Xu, Yue Xiong, Xiaopei Zhang, Junyang Qi, Xun Lin, Chengjun Chu, Lan Shen, Gan Liu, Wenbin Deng. Black phosphorus nanosheets suppress oxidative damage of stem cells for improved neurological recovery[J]. Chemical Engineering Journal, 2023, 451.
- [4] Y. Wang, W. Wang, R. Gu, J. Chen, Q. Chen, T. Lin, J. Wu, Y. Hu, A. Yuan. In Situ Vaccination with Mitochondria-Targeting Immunogenic Death Inducer Elicits CD8+ T Cell-Dependent Antitumor Immunity to Boost Tumor Immunotherapy[J]. Adv. Sci, 2023, 10.
- [5] Yin, H., Sun, Y., Ya, B. et al. Apelin-13 protects against cisplatin-induced ototoxicity by inhibiting apoptosis and regulating STAT1 and STAT3[J]. Arch Toxicol, 2023, 97:2477-2493.
- [6] Li W, Zhou P, Yan B, et al. Disc regeneration by injectable fucoidan-methacrylated dextran hydrogels through mechanical transduction and macrophage immunomodulation[J]. Journal of Tissue Engineering, 2023, 14.
- [7] Chen, XS., Cui, JR., Meng, XL. et al. Angiotensin-(1-7) ameliorates

sepsis-induced cardiomyopathy by alleviating inflammatory response and mitochondrial damage through the NF- κ B and MAPK pathways[J].J Transl Med,2023.

[8] Chen, J., Zhu, T., Jiang, G.et al.Target delivery of a PD-1-TREM2 scFv by CAR-T cells enhances anti-tumor efficacy in colorectal cancer[J].Mol Cancer ,2023.

[9] Li, L., Zhang, M., Li, J.et al.Cholesterol removal improves performance of a model biomimetic system to co-deliver a photothermal agent and a STING agonist for cancer immunotherapy[J].Nat Commun,2023.

[10] 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,2023.

[11] Chen, X., Liu, J., Li, Y.et al.IDH1 mutation impairs antiviral response and potentiates oncolytic virotherapy in glioma[J].Nat Commun,2023.

[12] Li, Z.; Zhu, Y.; Yan, F.; Jin, H.; Wang, Q.; Zhao, Y.; Feng, N.; Wang, T.; Li, N.; Yang, S.; et al. Inactivated Recombinant Rabies Virus Displaying the Nipah Virus Envelope Glycoproteins Induces Systemic Immune Responses in Mice[J].Vaccines 2023,11.

[13] Li, L., Yin, J., Ma, W.et al.A DNA origami device spatially controlsCD95 signalling to induce immune tolerance in rheumatoid arthritis[J].Nat. Mater,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
非常弱的结果	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。
标准曲线和复孔重复性差	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。
阳性对照不显色	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。
高背景	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

电话：010-57794997

邮箱：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