Speedy™ 人/食蟹猴TNF-alpha一步法ELISA检测试剂盒

请在实验前仔细阅读本说明书

产品货号： SE50002

规 格： 96T

灵敏度： 1.1 pg/mL

检测范围: 3.9-250 pg/mL

用 途： 此试剂盒用于定量检测血清、血浆以及细胞上清中的人/食蟹猴TNF-alpha浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

目录

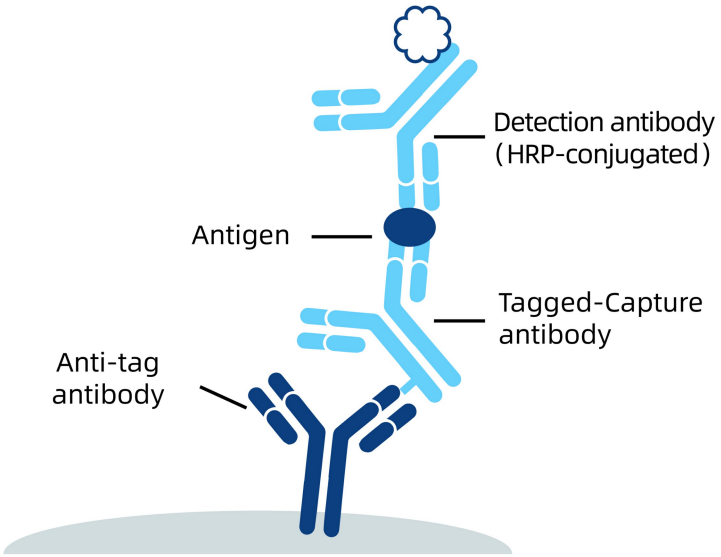
一：背景信息 3
二：检测原理 3
三：需自备的实验器材 3
四：试剂盒组分及储存 4
五：实验注意事项 4
六：样本准备 4
七：试剂准备 5
八：实验步骤 6
九：实验参数 8
9.1 参考标曲图 8
9.2 精密度 8
9.3 加标回收率 9
9.4 样本值 9
9.5 灵敏度 9
9.6 线性 10
9.7 校准 10
9.8 特异性 10
十：参考文献 10

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

一：背景信息

TNF，也称为TNF-α或恶液质素，是一种多功能促炎细胞因子，属于肿瘤坏死因子（TNF）超家族。它以26 kDa膜结合蛋白的形式表达，然后被TNF-α转化酶（TACE）切割以释放可溶性17 kDa单体，在循环中形成同源三聚体。它主要由活化的巨噬细胞产生，但也可由许多其他类型的细胞产生，如CD4+淋巴细胞、NK细胞、中性粒细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞和神经元。它可以与受体TNFRSF1A/TNFR1和TNFRSF1B/TNFBR结合并通过其发挥作用。这种细胞因子参与调节广泛的生物学过程，包括细胞增殖、分化、凋亡、脂质代谢和凝血。TNF产生的失调与多种人类疾病有关，包括阿尔茨海默病、癌症、抑郁症和炎症性肠病（IBD）。

二：检测原理



抗标签抗体预先包被于板孔，可结合带标签的捕获抗体。抗原或样本、捕获抗体及辣根过氧化物酶（HRP）标记的检测抗体加入后，在溶液中形成夹心复合物。在HRP催化下，四甲基联苯胺（TMB）使底物溶液由无色变蓝，加入终止液后变黄。溶液颜色深浅与结合蛋白量成正比。测量波长为450 nm，校正波长为630 nm。

三：需自备的实验器材

3.1 酶标仪 (可读取450 nm和630 nm双波长)；

3.2 高精度移液器及一次性移液器枪头；

3.3 洗板机 (亦可手动洗板)；

3.4 EP管 (用于稀释标准品及样本)；

3.5 吸水毛巾或滤纸 (用于拍干)；

3.6 烧杯和量筒；

3.7 用于ELISA实验的数据分析的统计拟合软件（推荐四参数拟合方法），如：Origin，ELISA Calc等。 也可使用Proteintech 公司数据分析网站：https: //www.ptgcn.com/products/elisa-kits/；

3.8 微孔板恒温振荡器。

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

四：试剂盒组分及储存

英文名称	中文名称	规格	数量
Microplate	预包被酶标板 - 96 孔板	8孔 × 12条	1 块
Protein standard	标准品 - 冻干粉状 *	500 pg/瓶	2 瓶
Capture antibody (100×)	捕获抗体浓缩液（100×） **	60 uL/管	1 管
Detection antibody, HRP-Conjugated (100×)	HRP 标记检测抗体浓缩液 （100×） **	60 uL/管	1 管
Sample Diluent PT 1-ef	样本稀释液 PT 1-ef（用于细胞上清样本）	30 mL/瓶	1 瓶
Sample Diluent PT 3	样本稀释液 PT 3（用于人血清和血浆样本）	30 mL/瓶	1 瓶
Detection Diluent	抗体稀释液	15 mL/瓶	1 瓶
Wash Buffer Concentrate (20×)	浓缩洗涤液（20×）	30 mL/瓶	1 瓶
Tetramethylbenzidine Substrate (TMB)	显色底物 TMB	12 mL/瓶	1 瓶
Stop Solution	终止液	12 mL/瓶	1 瓶
Plate Cover Seals	封板膜		4张
储存条件： 1：未开启试剂盒可在2-8°C条件下存放6个月或者在-20°C条件下存放1年 2：已开启试剂盒可在2-8°C存放7天 3：每次实验均使用新的标准品,使用后丢弃			

* 使用对应的样本稀释液对标准品进行复溶，详见7.4部分，复溶过程避免产生气泡

** 开盖前请离心

五：实验注意事项

5.1 避免皮肤接触终止液以及TMB 显色液；

5.2 在实验过程中，注意穿戴个人防护装备，如实验服，手套，口罩和护目镜；

5.3 请勿将不同批次的试剂进行混用，过期产品请勿使用；

5.4 在使用自动洗板机时，板孔加入洗涤液之后，设置30秒的浸泡程序，以提高分析的精确度。

六：样本准备

6.1 血清：全血标本室温凝固 30 min后1000×g 离心15 min，取上清立即使用或分装后-20°C存放，避免反复冻融。

6.2 血浆: 可用EDTA、肝素或柠檬酸盐作为抗凝剂，标本采集后1000×g 离心15 min，立即使用或分装后-20°C存放，避免反复冻融(注意：标本溶血会影响检测结果，因此溶血标本不宜进行检测)。

6.3 细胞上清: 收集细胞培养液，500×g 离心5 min取上清，立即使用或分装后-20°C存放，避免反复冻融。

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

七：试剂准备

7.1 洗涤液（1×）的配制：

如果洗涤液（20×）有晶体析出，37°C加热至晶体全部溶解。按1:20稀释倍数进行稀释：如取30 mL 浓缩洗涤液（20×），加入570 mL 超纯水或去离子水，得到1×洗涤液。

7.2 抗体混合液（1×）的配制：

开盖前瞬时离心，将捕获抗体和检测抗体稀释分别按1:100比例稀释到到同一管稀释液中，配制成检测所需的工作液。例如：将50 uL包被抗体浓缩液（100×）和50 uL检测抗体浓缩液（100×）加入 4900 uL抗体稀释液，混匀配制成1×抗体混合液。

7.3 待检测样本：

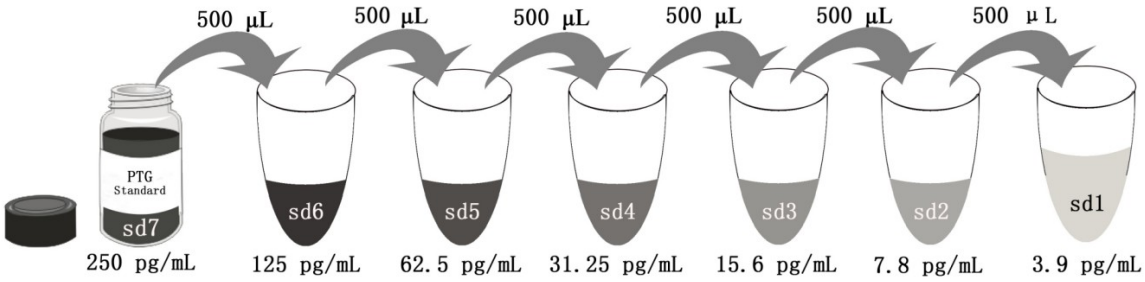
不同的样本使用相应的样本稀释液进行稀释，样本最低稀释比为1:2，即每个样本孔中最多加入样本原液25 uL。

如果样本检测值超过标曲最高范围，可将样本进一步稀释后再进行实验，使样本的检测值处于标曲范围内，不同样本的稀释倍数需自行优化。

稀释比推荐如下：人血清和血浆样本1:2稀释；细胞上清样本1:2到1:80稀释；样品采集、处理和储存的差异可能导致测值的改变。

7.4 梯度稀释的标准品：

检测人血清和血浆样本，用2 mL PT 3样本稀释液复溶标准品；检测细胞上清样本，用2 mL PT 1-ef样本稀释液复溶标准品。具体操作如下：



Add # µL of Standard diluted in the previous step	—	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
# µL of Sample Diluent PT 3 or PT 1-ef	**2000 µL**	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
	"sd7"	"sd6"	"sd5"	"sd4"	"sd3"	"sd2"	"sd1"

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

八：实验步骤

实验前，需要将所需试剂在室温平衡20-30 min（捕获抗体浓缩液和HRP标记检测抗体浓缩液不需要平衡室温，即用即取）； 在进行标准品、样本以及不同试剂加样时，更换枪头，避免接触微孔板的内表面，不同的试剂，使用不同的加样槽；

8.1 根据实验用量，取出需要用到的酶标板条，剩余板条加入干燥剂放入铝箔袋密封后存放于4°C，并于一周之内用完；

8.2 加样，分别设零孔、标准孔、待测样本孔。零孔加样本稀释液50 µL，余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本50 µL/孔，注意不要产生气泡（建议标准品和样本都做复孔，尽量避免实验误差，确保上样不间断，5-10 min 完成加样）；

8.3 每孔加50 µL 抗体混合液（1×）(参照试剂准备部分7.2)，盖上封板膜，恒温振荡器上37°C 400 rpm 孵育 1 h（若无恒温振荡器，此步骤建议37°C静置孵育2 h）；

8.4 洗涤

1） 揭开封板膜（动作轻柔，避免动作过大导致液体溢出串孔），弃液体，拍干；

2） 洗涤液（1×）洗涤板条，每孔350-400 µL，洗涤后，甩掉液体拍干板条，重复此步骤4次，避免异物进入板孔；

8.5 显色：每孔加TMB显色液100 µL，恒温振荡器上37°C 400 rpm 孵育15-20 min（如果颜色偏浅，可适当延长显色时间，不超过30 min；保持显色底物始终处于避光状态，显色底物在加样前应是无色透明，如有变色，请勿使用）；

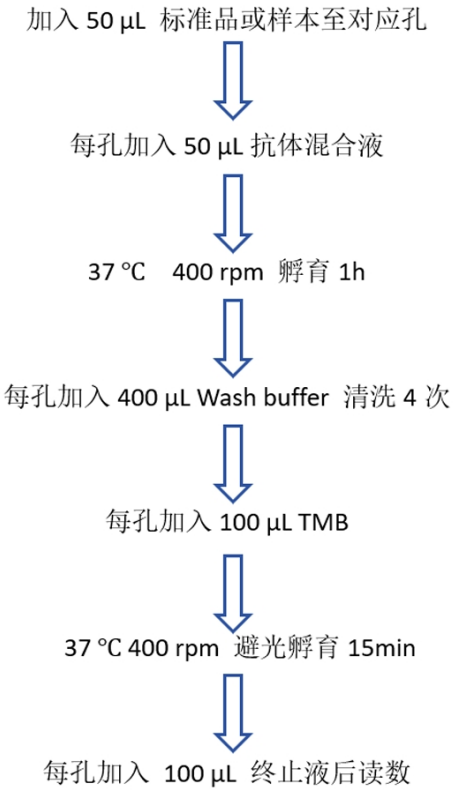
8.6 终止：每孔加终止液100 µL，蓝色变黄色。终止液与TMB显色液的加样顺序一致；（注意：眼睛和皮肤避免 接触终止液）

8.7 读数：以630 nm为校正波长，用酶标仪在450 nm波长测量各孔的光密度(OD值)。加入终止液后5 min内进行读数，若无630 nm波长，也可直接使用450 nm波长读数；

8.8 数据分析: 每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD值为纵坐标，使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

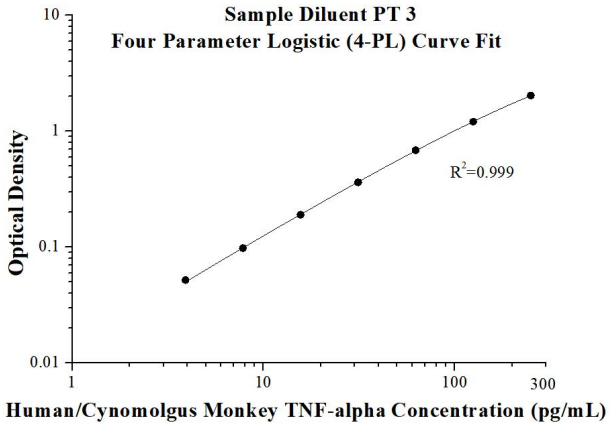
操作流程如下：



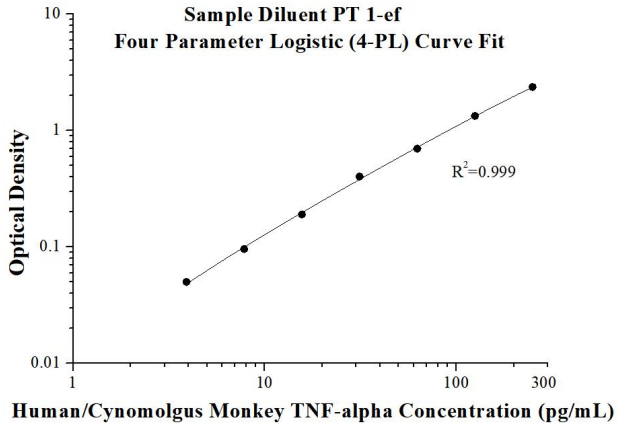
USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

九：实验参数

9.1 参考标曲图



(pg/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.0345 0.0326	0.03355	-
3.9	0.0855 0.0861	0.0858	0.0523
7.8	0.1332 0.1306	0.1319	0.0984
15.6	0.2273 0.2195	0.2234	0.1899
31.25	0.3981 0.3935	0.3958	0.3623
62.5	0.7237 0.7125	0.7181	0.68455
125	1.2582 1.2285	1.24335	1.2098
250	2.0698 2.0601	2.06495	2.0314



(pg/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.0408 0.0366	0.0387	-
3.9	0.0899 0.0875	0.0887	0.05
7.8	0.1351 0.1333	0.1342	0.0955
15.6	0.231 0.2268	0.2289	0.1902
31.25	0.4408 0.4431	0.44195	0.4033
62.5	0.7418 0.7341	0.738	0.69925
125	1.3619 1.3846	1.37325	1.3346
250	2.3682 2.4506	2.4094	2.3707

9.2 精密度

板内精密度: 3个不同浓度的样本在板内重复测定 8 次；

板间精密度: 3个不同浓度的样本在板间重复测定 16 次。

板内精密度 (CV内)				
样本	数量	平均值 (pg/mL)	标准差	变异系数CV%
1	8	128.6	7.6	5.9
2	8	30.3	0.8	2.8
3	8	15.1	0.4	2.5

板间精密度 (CV 间)				
样本	数量	平均值 (pg/mL)	标准差	变异系数CV%
1	16	127.7	6.2	4.9
2	16	30.5	1.0	3.3
3	16	15.2	0.5	3.4

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

9.3 加标回收率

样本稀释后，在标曲范围内选择高、中、低3个浓度，进行人/食蟹猴TNF-alpha的加标回收率实验，结果如下：

样本类型	稀释倍数	平均值 (%)	范围 (%)
人血清	1:2	84	76-93
	1:4	91	80-99
细胞上清	1:100	109	104-112
	1:200	105	100-108

9.4 样本值

人血清 - 应用本试剂盒，检测人血清样本中TNF-alpha的浓度

样本类型	均值 (pg/mL)	检出率 (%)	范围 (pg/mL)
人血清样本 (n=8)	6.3	50	ND-16.1

ND*=Non-detectable

细胞上清:

人外周血单个核细胞(1 x 10^6 cells/mL)在含有10% 胎牛血清、5 μM β-巯基乙醇、2 mM L-谷氨酰胺、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素的DMEM培养基中培养。用10 μg/mL 植物血凝素PHA 刺激细胞3天和5天。收集细胞上清，检测TNF-alpha的浓度。

刺激条件	3天 (pg/mL)	5天 (pg/mL)
未刺激	13.1	12.3
刺激	12107.3	11366.0

食蟹猴外周血单个核细胞(1 x 10^6 cells/mL)在含有10% 胎牛血清、5 μM β-巯基乙醇、2 mM L-谷氨酰胺、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素的DMEM培养基中培养 。细胞分别在未刺激或用50 ng/mL PMA和1 μg/mL calcium Ionomycin刺激下培养1天。收集细胞上清，检测TNF-alpha的浓度。

刺激条件	1天 (pg/mL)
未刺激	496.4
刺激	5203.6

9.5 灵敏度

用20个重复的零孔平均OD值加上两倍标准差得到的OD值带入标准曲线拟合出对应的浓度值，此试剂盒中人/食蟹猴TNF-alpha的灵敏度为1.1 pg/mL。

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

9.6 线性

人血清加入高浓度的人TNF-alpha蛋白，梯度稀释后检测样本加标线性，细胞上清用对应样本稀释液稀释样本，使稀释后的检测值处于标曲范围内，线性数据如下：

（人细胞上清样本预先稀释40倍，食蟹猴细胞上清样本预先稀释10倍。）

		人血清 (样本稀释液 PT 3)	人细胞上清 (样本稀释液 PT 1-ef)	食蟹猴细胞上清 (样本稀释液 PT 1-ef)
1:2	均值（%）	89	100	100
	范围（%）	85-94	-	-
1:4	均值（%）	102	101	100
	范围（%）	101-103	99-103	99-101
1:8	均值（%）	105	102	94
	范围（%）	100-109	101-103	84-103
1:16	均值（%）	118	107	100
	范围（%）	109-127	102-113	95-104

9.7 校准

本试剂盒采用NIBSC 12/154 (人TNF-alpha) 作为校准品进行校正。该校正品与标准品蛋白呈线性关系，倍数如下：

NIBSC (12/154) approximate value (IU/mL)=0.04×Proteintech Human TNF-alpha value (pg/mL)

9.8 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人/食蟹猴TNF-alpha，加入50 ng/mL以下类似物或干扰物，无明显交叉反应。

Human:	Mouse:	Rat:
TNF-β	TNF-α	TNF-α
TNF RII		
TNFSF13		

十：参考文献

1. Buchegger, F et al. International journal of cancer vol. 33,5 (1984): 643-9.
2. Zhao, Linshu et al. British journal of haematology vol. 125,5 (2004): 666-73.
3. Kuroki, M et al. Journal of leukocyte biology vol. 70,4 (2001): 543-50.
4. Oikawa, S et al. The Journal of biological chemistry vol. 266,13 (1991): 7995-8001.
5. Yamanka, T et al. Biochemical and biophysical research communications vol. 219,3 (1996): 842-7.

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com