猪 TNF-α ELISA快速检测试剂盒

Porcine TNF-α ELISA kit (Quick Test)

Cat#：EPC002aQT

尊敬的客户，感谢您选用本公司 ELISA 快速检测试剂盒。本产品选用世界著名生产厂家的原料，采用专业体外诊断试剂生产技术制造，仅供科研使用。本产品可检测血清、血浆、细胞培养上清液、灌洗液、尿液、羊水、腹水、脑脊液、胸腔积液、组织匀浆液等多种类型样本中天然和重组猪 TNF-α浓度，具体适用样本请咨询。使用前请仔细阅读说明书并检查试剂组分。如有疑问，请联系欣博盛生物科技有限公司。Email: tech@neobioscience.com，全国服务热线: 4006 800 892。

欣博盛
NEOBIOSCIENCE

试剂盒组成：

名　称	48T	96T
抗体预包被酶标板	8×6	8×12
冻干标准品	**1 ng/支**×1 支	**1 ng/支**×2 支
标准品&标本通用稀释液	12 ml×1 瓶	20 ml×1 瓶
浓缩生物素化抗体	1 支（规格见标签）	1 支（规格见标签）
生物素化抗体稀释液	10 ml×1 瓶	16 ml×1 瓶
浓缩酶结合物	1 支（规格见标签）	1 支（规格见标签）
酶结合物稀释液	10 ml×1 瓶	16 ml×1 瓶
浓缩洗涤液 20×	25 ml×1 瓶	50 ml×1 瓶
显色底物（TMB）	6 ml×1 瓶	12 ml×1 瓶
反应终止液 ***具腐蚀性***	6 ml×1 瓶	12 ml×1 瓶
封板胶纸	3 张	6 张
产品说明书	1 份	1 份

储存条件：

未开封完整试剂盒		4℃保存，请在保质期内使用。
已开封试剂盒	抗体包被板条	未用完的板条放回带拉链铝箔袋，密封好。4℃条件下可储存 1 个月左右。
	标准品	冻干粉-20℃可储存 6 个月左右。复溶后标准品使用后立即丢弃。
	浓缩生物素化抗体	浓缩液 4℃可储存 1 个月左右，稀释后即用即弃。
	浓缩酶结合物（避光）	
	标准品&标本通用稀释液	4℃条件下，可储存 1 个月左右，开瓶后密封好防止污染。
	生物素化抗体稀释液	
	酶结合物稀释液	
	显色底物（避光）	
	反应终止液	
	浓缩洗涤液 20×	

备注：所有试剂的批号见标签。

检测原理:

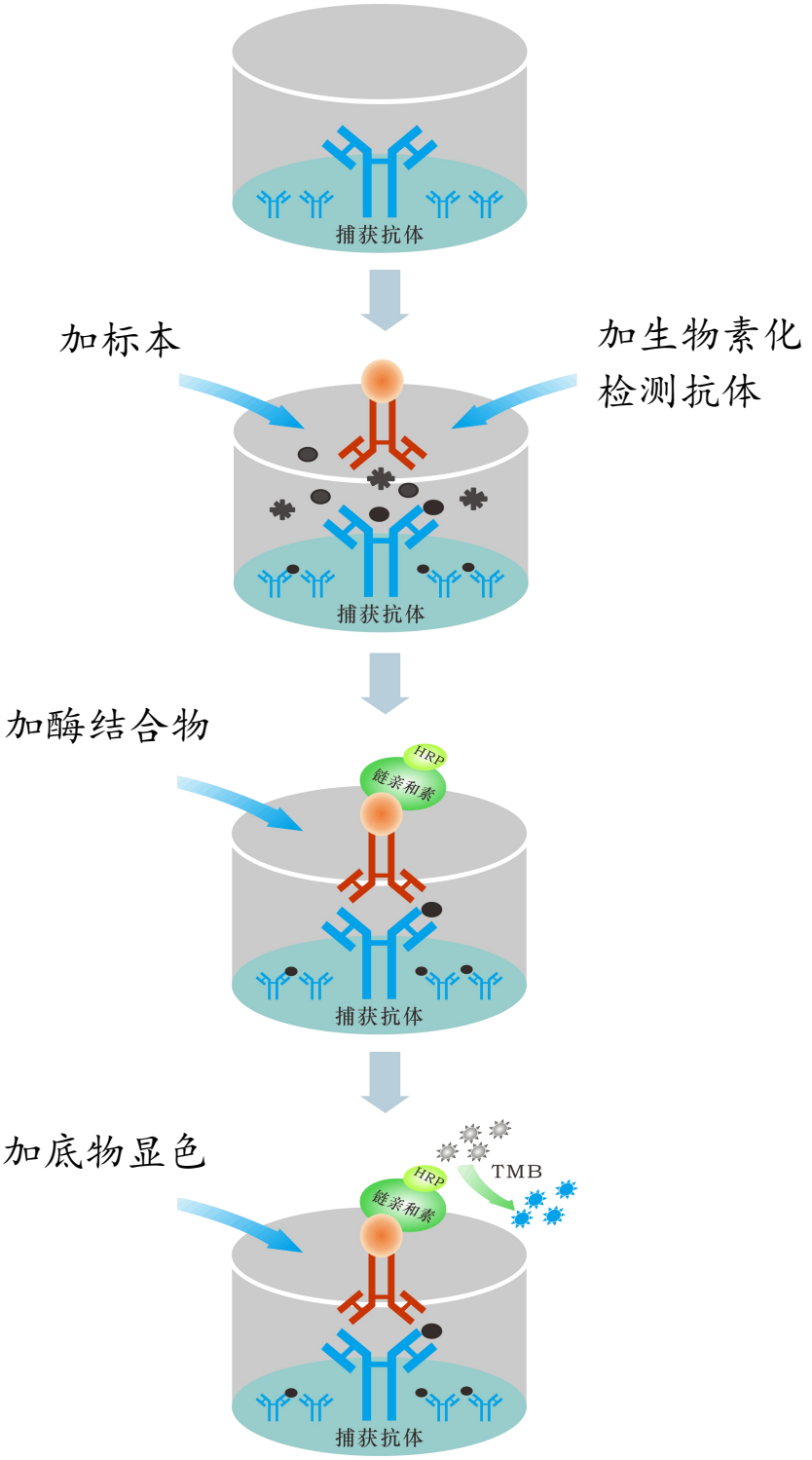
欣博盛ELISA快速检测试剂盒采用双抗体夹心法：抗猪TNF-α单抗包被于酶标板上，标本和标准品中的猪TNF-α会与单抗结合，游离的成分被洗去。加入生物素化的抗猪TNF-α抗体和辣根过氧化物酶标记的亲和素，生物素与亲和素特异性结合；抗猪TNF-α抗体与结合在单抗上的猪TNF-α结合而形成免疫复合物，游离的成分被洗去。加入显色底物，若反应孔中有猪TNF-α，辣根过氧化物酶会使无色的显色剂现蓝色，加终止液变黄。在450 nm处测OD值，猪TNF-α浓度与OD_{450}值之间呈正相关关系，可通过绘制标准曲线求出标本中猪TNF-α的浓度。

试验所需自备试验器材 (不提供，但可协助购买):

1. 酶标仪(450 nm波长滤光片)
2. 进口品牌高精度加液器及一次性吸头：0.5-10 ul, 2-20 ul, 20-200 ul, 200-1000 ul。
3. 37 ˚C恒温箱，双蒸水或去离子水，坐标纸等。

可协助代购相关产品，请咨询。

快速检测ELISA原理图：



标本收集:

1. 收集血液的试管应为一次性的无热原，无内毒素试管。
2. 血浆抗凝剂推荐使用EDTA。避免使用溶血，高血脂标本。
3. 标本应清澈透明，悬浮物应离心去除。
4. **标本收集**后若不及时检测，请按一次使用量分装，冻存于-20 ℃，-70 ℃电冰箱内，避免反复冻融，3-6月内检测。
5. 如果您的样本中检测物浓度高于标准品最高值，请根据实际情况，用试剂盒的标本稀释液做适当倍数稀释(建议做预实验，以确定稀释倍数)。

注意事项:

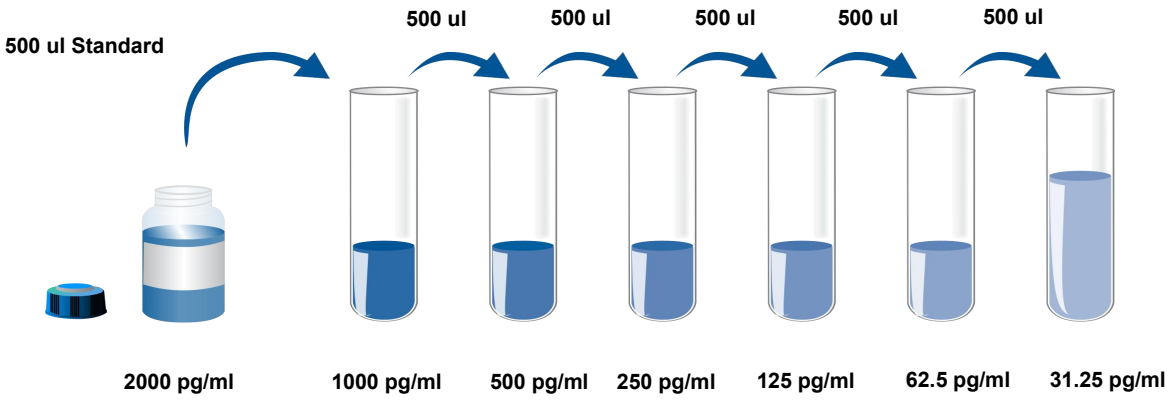
1. 试剂盒使用前请保存在2-8 ℃。请每次实验使用新复溶的标准品。
2. 浓缩生物素化抗体，浓缩酶结合物体积小，运输中颠簸和可能的倒置，会使液体沾到管壁或瓶盖。使用前请1000转/分离心1分钟，以使附着管壁或瓶盖的液体沉积到管底。取用前，请用移液器小心吹打4-5次使溶液混匀。
3. 从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶,属于正常现象，微加热至37℃使结晶完全溶解后再配制洗涤液。
4. 不同批号的试剂盒组份不能混用（洗涤液和反应终止液除外）。请提前咨询欣博盛生物科技有限公司。
5. 加样后充分轻微混匀对反应结果尤为重要，最好使用微量振荡器(使用最低频率)，如无微量振荡器，可在反应前手工轻轻敲击酶标板框混匀。
6. 在试验中标准品和样本检测时建议作双孔检测。
7. 试验中所用的试管和吸头均为一次性使用，**严禁在不同的液体之间混用！否则将影响试验结果。**
8. 试验中请穿着试验服并戴乳胶手套做好防护工作。特别是检测血液或者其他体液标本时，请按国家生物试验室安全防护条列执行。
9. **如试剂盒需分几次实验，请根据需要量配制各组分**，以免配制过多造成浪费而影响后续试验。**剩余板孔请用封板胶纸封住，放回铝箔袋中,1个月内用完。**

检测前准备工作:

1. 请提前20分钟从冰箱中取出试剂盒，以平衡至室温。
2. 用双蒸水将**20×浓缩洗涤液**稀释成**1×工作液**。未用完的放回4 ℃。
3. 标准品：开盖前1000 rpm离心1min。加入标准品&标本通用稀释液**0.5 ml**至冻干标准品中，静置15分钟，待其充分溶解后，轻轻混匀(浓度为**2000 pg/ml**)。然后根据需要进行稀释。(建议标准曲线使用以下浓度：**2000、1000、500、250、125、62.5、31.25、0 pg/ml**)。0 pg/ml即空白对照孔。复溶标准品原液(**2000 pg/ml**)若未用完的请废弃。
4. 生物素化抗体工作液：按当次试验所需要的用量，使用前20分钟，用生物素化抗体稀释液将**30×浓缩生物素化抗体**稀释成**1×工作液**。当日使用。若实验次数过多导致生物素化抗体量不足，可向欣博盛公司单独购买生物素化抗体。（须提供抗体批号）
5. 酶结合物工作液：按当次试验所需要的用量，使用前20分钟，用酶结合物稀释液将**30×浓缩酶结合物**稀释成**1×工作液**。当日使用。若实验次数过多导致浓缩酶结合物量不足，可向欣博盛公司单独购买浓缩酶结合物。（须提供酶结合物批号）

标准品稀释方法图例:

以500ul/管为例，用标准品&标本通用稀释液将复溶后的标准品母液进行倍比稀释（实验中可根据实际需要的体积，自行换算稀释），具体稀释方法如下图：



洗涤方法:

1. 自动洗板机：要求注入的洗涤液为350 ul，注入与吸出间隔30—60秒。洗板5次。
2. 手工洗板：甩尽孔内液体，在洁净的吸水纸上拍干，每孔加洗涤液350 ul，静置30秒后甩尽液体，在厚迭吸水纸上拍干。洗板5次。

操作步骤:

1. 提前准备生物素化抗体工作液。
2. 从已平衡至室温的密封袋中取出试验所需板条，未用的板条和干燥剂请放回铝箔袋内压实自封条，密封口袋，放回4℃。
3. 空白对照孔加**标准品&标本通用稀释液**，其余相应孔中加标本或不同浓度标准品(100 ul/孔)，建议标准品和标本都做复孔，尽量避免实验误差。
4. 每孔加入生物素化抗体工作液(100 ul/孔)，保证步骤3、4 连续加样，不要间断，注意加样不要产生气泡。加样过程在10-15分钟内完成。**加样后务必用手动敲击酶标板混匀，动作轻柔。**用封板胶纸封住反应孔，37℃恒温箱，避光孵育60分钟。
5. 提前20分钟准备酶结合物工作液。避光室温(22-25℃)放置。
6. 揭开封板胶纸（动作轻柔，避免动作过大导致溢出串孔）洗板5次。
7. 每孔加入酶结合物工作液(100 ul/孔)。用新封板胶纸封住，37℃恒温箱，避光孵育20分钟。
8. 打开酶标仪电源，预热仪器，设置好检测程序。
9. 重复步骤6。
10. 加入显色底物(TMB)100 ul/孔，37℃恒温箱，避光孵育15分钟。
11. 加入反应终止液100 ul/孔，混匀后即刻测量OD_{450}值 (3分钟内)。在仪器保存读数结果并打印一份纸质结果。
12. 实验完毕后将未用完的试剂按规定的保存温度放回电冰箱保存至有效期结束。

    建议保存酶标板框，以备下次试验使用。

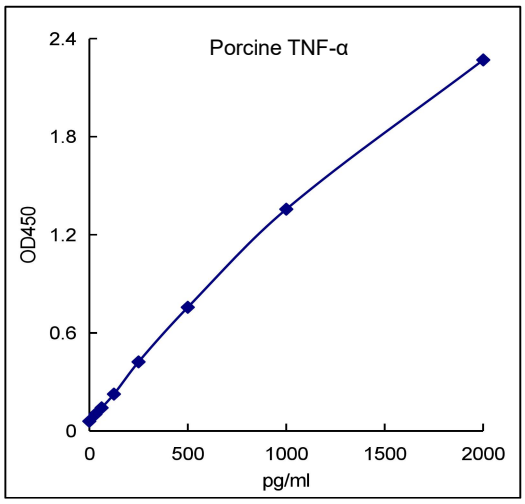
结果判断：

1. 每个标准品和标本的OD值应减去空白对照孔的OD值。
2. 以标准品浓度作横坐标，OD值作纵坐标，手工绘制或用软件绘制并选取最佳拟合曲线，推荐使用二次多项式方程拟合。通过标本的OD值可在标准曲线上查出其浓度。
3. 若标本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。

Chart of data

Dose (*pg/ml*)	Raw Data		Average	Corrected
0	0.058	0.061	0.060	
31.25	0.105	0.100	0.103	0.043
62.5	0.145	0.138	0.142	0.082
125	0.231	0.220	0.226	0.166
250	0.429	0.417	0.423	0.364
500	0.763	0.750	0.757	0.697
1000	1.363	1.351	1.357	1.298
2000	2.274	2.266	2.270	2.211

Plot porcine TNF-α *standard curve*



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标本中猪TNF-α的含量。

灵敏度、特异性和重复性:

- 灵敏度：最小可测猪TNF-α达15.63 pg/ml。
- 特异性：本试剂盒特异性识别天然和重组猪TNF-α，不与human TNF-β，human和mouse TNF RI，TNF RII，rat TNF-α反应。
- 重复性：板内，板间变异系数均<10%。

	板内重复性			板间重复性		
样本	1	2	3	1	2	3
重复次数	10	10	10	8	8	8
平均值(*pg/ml*)	1423.6	386.5	96.7	1125.8	312.1	75.9
标准差	111.0	29.8	7.7	88.9	25.0	6.1
变异系数(%)	7.8	7.7	8.0	7.9	8.0	8.1

猪 TNF-α简介：

肿瘤坏死因子-α (Tumor necrosis factor alpha, TNF-α)，也称恶液质素，是TNF配体超家族的成员之一，曾被命名为TNFSF1A。TNF-α对某些肿瘤的生长有抑制作用，并作为免疫调节剂在炎症反应和宿主抗感染中起到重要的作用。TNF-α主要由活化的巨噬细胞产生，其他猪细胞类型，包括NK细胞，角质形成细胞，血管平滑肌细胞和颗粒黄体素细胞等也可以产生TNF-α。

猪TNF-α分子是由232个氨基酸(Amino acid, aa)残基组成的II型膜糖蛋白，包含35 aa的胞质结构域，21 aa的跨膜结构域和178 aa的胞外结构域。在TNF-α转换酶(TACE, ADAM17)的作用下，由156个氨基酸残基组成的可溶性TNF-α从膜蛋白的C-末端释放，具有生物活性的TNF-α以三聚体的形式存在。猪TNF-α在小鼠细胞中呈阳性表达，分别与人和小鼠TNF-α具有89%和79%的氨基酸序列同源性。

目前已知有两种TNF受体，I型(type B, p55或TNFRSF1A)和II型(type A, p75, or TNFRSF1B)，特异性的结合TNF-α和TNF-β。两个TNF受体在胞外的氨基酸序列具有同源性，而在胞质区域则没有，这使得两个受体具有不同的信号转导通路。在人和小鼠的血清中已发现两种受体的可溶形式，这些可溶性受体可以中和肿瘤坏死因子的生物活性，调节肿瘤坏死因子的活性。

Rev 251204SY

ELISA 常见问题分析：

问题一：高背景或阴性对照值偏高

可能原因	建议
阴性对照孔被阳性对照或样品污染	洗涤时，避免孔间交叉污染。
洗涤不充分	确保在洗涤时每个孔都充满了液体，确保将残余液体从孔中移除。
酶结合物过浓	请检查酶结合物是否按说明书规定稀释
孵育温度过高	检查恒温箱的温度是否正确、稳定
底物在使用前曝光	应保存在暗处，避光。
读板前停留时间过长	加终止液后 3 分钟内读数

问题二：阳性对照值偏低或低吸光度

可能原因	建议
试剂未平衡至室温	开始实验前，将试剂盒平衡至室温
包袋中有湿气	首次开袋标上日期，封好未使用的孔条，放入干燥剂。
样本中有抑制剂	叠氮化钠抑制 HRP 的活性
试剂在使用前未混匀	使用前混匀试剂
洗涤步骤过于剧烈	降低洗涤系统的压力
实验开始后，微孔变干燥	实验过程勿中断，应连续完成所有的实验步骤。
检测体积偏小	确保移液器已校正

问题三：边缘效应

可能原因	建议
蒸发	各步之间，须使用封版胶密封反应板。
温度不均匀	校准恒温箱，勿叠放反应板。

问题四：标准曲线不佳

可能原因	建议
倍比稀释标准品时未混匀	稀释标准品的每一步均需混匀
过早稀释	标准品在快要使用时稀释
加入的体积不正确	使用校准过的移液器，快速、等量的将标准品分配到各个微孔中。

问题五：标准曲线良好，但样本无检测信号

可能原因	建议
样本中无检测物或检测物含量极低	设置内参，重新实验
样本中其他物质影响/掩盖检测	作适当稀释，降低其他物质的干扰，或作系列稀释，检测回收率。
样本中检测物浓度过高，Hook 效应导致假低值	适当倍数稀释样本，检测物浓度尽量在试剂盒检测范围内。

问题六：重复性较差

可能原因	建议
微孔中有气泡	用枪头挑破气泡
试剂未混匀	确保充分混匀试剂
样本中有杂质或沉淀物	使用前离心
微孔包被面被吸头划破	加液时小心操作
使用用过的封板胶纸	每次须使用新的封板胶封住反应孔