

货号	名称	规格
BSEH-019-48T	Human TNF- α (肿瘤坏死因子 α) ELISA KIT	48T
BSEH-019-96T	Human TNF- α (肿瘤坏死因子 α) ELISA KIT	96T

Elisa试剂盒使用说明书

Human TNF- α ELISA Kit

本试剂盒用于定量检测人血清、血浆或细胞培养上清液等样本中天然和重组TNF- α 浓度。使用前请仔细阅读说明书并检查试剂组分,如有任何疑问请与合肥兰杰柯科技有限公司联系,公司将为您提供强有力的技术支持。



全国统一热线: 400-600-4213
www.biosharp.cn

目录

一、产品简介	2
二、检测原理	2
三、试剂盒组分	3
四、储存条件	3
五、注意事项	3
六、其它实验材料	4
七、使用说明	4
1、样品收集、处理及保存方法	4
2、试剂准备	4
3、操作步骤	5
4、操作流程图	6
5、操作要点提示	6
6、结果判断	6
八、常见问题分析及解决	8

一、产品简介

TNF- α 是一种主要由单核细胞和巨噬细胞产生的单核因子。1975年, Carswell等人发现卡介苗攻击小鼠后再用内毒素处理, 小鼠血清中出现一种能诱导肿瘤组织出血坏死的物质, 故命名为肿瘤坏死因子。1985年Shalaby把巨噬细胞产生的TNF命名为TNF- α , 把T淋巴细胞产生的淋巴毒素命名为TNF- β 。

人的TNF- α 约2.76kb, 由4个外显子和3个内含子组成。人TNF- α 前体由233个氨基酸残基组成, 切除含76个氨基酸残基的信号肽后, 形成的成熟型TNF- α 为157个氨基酸残基。人TNF- α 分子量为17kDa。在氨基酸水平上, 人与鼠的TNF- α 有79%同源性, TNF- α 的生物学作用无明显的种属特异性。

人类多种细胞均可表达TNF- α , 包括B细胞, 结肠柱状上皮细胞, NK细胞, 巨噬细胞, 单核细胞, 肥大细胞, 中性粒细胞等。

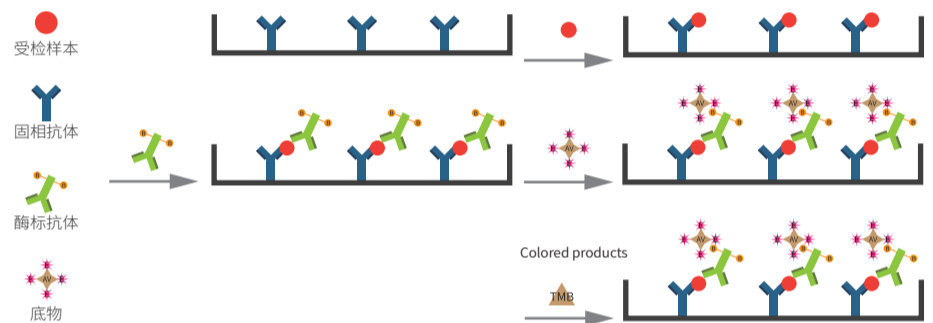
TNF- α 的生物学活性非常复杂, 包括对造血、免疫和炎症的调节; 对血管和凝血的影响和对多种器官(肝、心脏、骨、软骨、肌肉和其它组织)的作用。

- (1) 杀伤或抑制肿瘤细胞: TNF在体内、体外均能杀死某些肿瘤细胞或抑制其增殖。
- (2) 提高中性粒细胞的吞噬能力, 增加过氧化物阴离子产生, 增强ADCC功能, 刺激细胞脱颗粒和分泌过氧化物酶。
- (3) 抗感染: 如抑制疟原虫生长, 抑制病毒复制、抑制病毒蛋白合成、病毒颗粒的产生和感染性, 并可杀伤病毒感染细胞。TNF抗病毒机理不十分清楚。
- (4) TNF是一种内源性热原质, 引起发热, 并诱导肝细胞急性期蛋白的合成。
- (5) 促进髓样白血病细胞向巨噬细胞分化。
- (6) 促进细胞增殖和分化: 增强IL-2依赖的胸腺细胞、T细胞增殖能力。TNF- α 对某些肿瘤细胞具有生长因子的作用, 并协同EGF、PDGF和胰岛素的促增殖作用, 促进EGF受体表达。最近报道TNF- β (LT)是EB病毒转化淋巴瘤细胞的自分泌生长因子, 抗LT抗体、sTNF R以及TNF- α 能抑制EB病毒转化淋巴细胞的增殖。

在临床上, 应用TNF在治疗肿瘤等方面开始临床II期试验, 也可与IL-2联合治疗肿瘤。TNF- α 的抗肿瘤作用包括TNF- α 的直接作用和TNF- α 诱导的针对肿瘤的免疫应答。TNF- α 参与包括哮喘, 2型糖尿病, Crohn's病, 和风湿性关节炎等疾病。TNF刺激内皮细胞, 导致炎症、组织损伤和凝血从而诱发感染性休克。TNF- α 又称恶液素, 可诱发机体发生恶液质。TNF还具有类似IFN抗病毒作用, 阻止病毒早期蛋白质的合成, 从而抑制病毒的复制, 并与IFN- α 和IFN- γ 协同抗病毒作用。

二、检测原理

本实验采用双抗体夹心ELISA。用抗人TNF- α 单克隆抗体预包被酶标板, 加入适度稀释的样本和标准品, 其中的TNF- α 会与其单抗结合, 洗去游离成分; 加入生物素化的抗人TNF- α 抗体, 抗人TNF- α 抗体与结合在单抗上的人TNF- α 结合而形成免疫复合物, 洗去游离的成分; 加入辣根过氧化物酶标记的亲合素, 生物素与亲合素特异性结合, 洗去未结合的酶结合物; 加入显色剂, 若反应孔中有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450nm下测OD值, TNF- α 浓度与OD₄₅₀值之间呈正比, 可通过绘制标准曲线计算出标本中TNF- α 浓度。



三、试剂盒组成

组分编号	组分	96t	48t	储存条件
BSEH-019-1	标准品	2支	1支	-20°C
BSEH-019-2	标准品和标本稀释液	1瓶	1瓶	2-8°C
BSEH-019-3	浓缩生物素化抗体	2支	1支	2-8°C
BSEH-019-4	生物素化抗体稀释液	1瓶	1瓶	2-8°C
BSEH-019-5	浓缩酶结合物(避光)	2支	1支	2-8°C
BSEH-019-6	酶结合物稀释液	1瓶	1瓶	2-8°C
BSEH-019-7	浓缩洗涤液20×	1瓶	1瓶	2-8°C
BSEH-019-8	显色剂(避光)	1瓶	1瓶	2-8°C
BSEH-019-9	终止液	1瓶	1瓶	2-8°C
BSEH-019-10	抗体包被板条	8×12	8×6	2-8°C
BSEH-019-11	封板胶纸	4张	2张	2-8°C
	说明书	1份	1份	

四、储存条件

未开封试剂盒2-8°C保存有效期6个月, 启封后建议一个月内使用完毕。产品收到后标准品-20°C保存, 其它组分2-8°C保存。

五、注意事项

1. 试剂盒保存在2-8°C, 除复溶后的标准品, 其它成分不可冷冻。
2. 浓缩生物素化抗体、浓缩酶结合物装量极少, 运输中颠簸和可能的倒置会使液体沾到管壁或瓶盖。使用前请离心处理以使附着于管壁或瓶盖的液体沉积到管底。
3. 不同批号试剂不可混用。
4. 为避免交叉污染请使用一次性吸头。
5. 终止液和显色剂具腐蚀性, 避免皮肤及粘膜直接接触, 一旦接触到这些液体, 请尽快用大量水冲洗。
6. 使用干净的塑料容器配制洗涤液, 使用前充分混匀试剂盒里的各种成份及样品。
7. 洗涤酶标板时应充分拍干, 不要将吸水纸直接放入酶标反应孔中吸水。
8. 不要用其它来源的试剂混合或替代该产品的组分, 不同批号的试剂盒组分不能混用, 请在有效期内使用本产品。
9. 在试验中标准品和样本检测时建议作双复孔或三复孔, 加入试剂的顺序应一致, 以保证所有反应孔孵育的时间一样。
10. 充分混匀对反应结果尤为重要, 最好使用微量振荡器(使用最低频率进行振荡)。
11. 避免操作过程中酶标板干燥, 干燥会使酶标板上生物成分迅速失活, 影响实验结果。
12. 适当的稀释样品, 使样品值落在标准曲线范围内, 根据待测因子含量高、中、低的不同, 建议采用1:100、1:10、1:2稀释样品。如果样品OD值高于最高标准, 适当增加稀释度并重复检测。
13. 标准品稀释液, 操作人, 移液方式, 洗涤方法, 孵育时间及温度, 试剂盒批次的不同均可能会导致结果的差异。
14. 此法可有效的消除可溶性受体、结合蛋白以及生物样品中的其他因素的干扰。

六、其它实验材料

1. 酶标仪(450nm)
2. 高精度可调移液器及吸头: 0.5-10, 2-20, 20-200, 200-1000 μ L; 一次检测样品较多时, 最好用多通道移液器
3. 自动洗板机或洗瓶
4. 37°C温箱
5. 双蒸水或去离子水
6. 坐标纸
7. 量筒

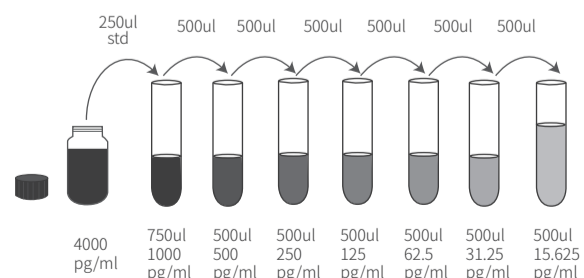
七、使用说明

7.1 样品收集、处理及保存方法

1. 血清: 使用不含热原和内毒素的试管, 收集血液后, 室温凝血30min, 1000×g离心10min, 小心分离血清。
2. 血浆: 用EDTA、柠檬酸盐、肝素作为抗凝剂收集血浆, 收集后30min内以1000×g离心15min去除颗粒。
3. 细胞上清液: 1000×g离心10min去除颗粒和聚合物。
4. 保存: 若样品不立即检测, 请将其按一次用量分装, -20°C~-70°C保存, 避免反复冻融。尽量避免使用溶血或高血脂样本。如果血清中含有大量颗粒, 检测前先离心或过滤去除; 室温下解冻, 请勿于37°C或更高的温度加热解冻。
5. 稀释: 可根据实际情况, 将标本做适当倍数稀释(建议做预实验, 以确定稀释倍数)。
注: 正常人血清或血浆样本建议做1:2稀释。

7.2 试剂准备

1. 提前30min从冰箱中取出试剂盒, 平衡至室温。
2. 洗涤缓冲液: 从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶, 这属于正常现象, 加热并轻轻摇晃使结晶完全溶解后再配制。将浓缩洗涤液用双蒸水稀释(1:20)。未用完的放回4°C。
3. 标准品: 加入标准品/标本稀释液1.0mL至冻干标准品中, 待彻底溶解后, 静置15分钟混匀(浓度为4000pg/mL), 然后根据需要进行稀释, 见下图(建议标准曲线使用以下浓度: 1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625、0pg/mL)。稀释的标准品不得重复使用, 未用完的标准品应按照一次用量分装后, 将其放在-20~-70°C贮存, 一次性使用, 避免反复冻融。



标准品稀释方法

