

# 产品说明书

## 猪肿瘤坏死因子 $\alpha$ ELISA 试剂盒 (Swine TNF- $\alpha$ ELISA Kit)

产品货号: S6159S, S6159M, S6159L

产品规格: 24T, 48T, 96T

产品内容:

规格 \ 组分	24T	48T	96T	使用方法	开封后保存条件
A. 标准品	1000 pg	1000 pg	2×1000 pg	按说明书进行稀释	-20℃可存放一月
B. 标准稀释液	16 mL	16 mL	16 mL	即用型	4℃可存放一月
C. 浓缩生物素化抗体 (100×)	15 $\mu$ L	30 $\mu$ L	2×30 $\mu$ L	按说明书进行稀释 (现配现用)	
D. 生物素化抗体稀释液	16 mL	16 mL	16 mL	即用型	
E. 浓缩酶结合物 (避光 100×)	30 $\mu$ L	60 $\mu$ L	2×60 $\mu$ L	按说明书进行稀释 (现配现用)	
F. 酶结合物稀释液	16 mL	16 mL	16 mL	即用型	
G. 浓缩洗涤液 (20×)	16 mL	16 mL	25 mL	即用型	
H. 显色剂 (避光)	6 mL	6 mL	12 mL	即用型	
I. 终止液	12 mL	12 mL	12 mL	即用型	
J. 预包被 96 孔板	8×3	8×6	8×12	即用型	密封干燥 4℃保存
K. 封板胶纸	1 张	2 张	4 张	即用型	

注: 终止液和显色剂具有腐蚀性, 一旦接触到液体, 请尽快用大量清水冲洗。

### 储存条件

4℃避光保存, 有效期见外包装。开封后, 保存温度详见说明书。

### 产品介绍

Swine TNF- $\alpha$  ELISA Kit (Swine Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay Kit), 即猪肿瘤坏死因子 $\alpha$  ELISA 试剂盒, 可以定量检测猪血清、血浆或细胞培养上清液等样本中的天然和重组 TNF- $\alpha$ 浓度。

TNF- $\alpha$ 是一种主要由单核细胞和巨噬细胞产生的单核因子。猪TNF- $\alpha$ 主要由活化的巨噬细胞表达, NK细胞, 角

质形成细胞, 血管平滑肌细胞, 和颗粒叶黄素细胞等也分泌 TNF- $\alpha$ 。猪TNF- $\alpha$ 是由232个氨基酸残基组成的II型膜糖蛋白, 含有一个35个氨基酸的胞质域, 一个21个氨基酸的跨膜结构域和一个178个氨基酸的胞外结构域。

TNF- $\alpha$ 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。如杀伤或抑制肿瘤细胞; 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髓过氧化物酶; 抗感染; 促进髓样白血病细胞向巨噬细胞分化; 促进细胞增殖和分化等。



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- $\alpha$  的抗肿瘤作用包括 TNF- $\alpha$  的直接作用和 TNF- $\alpha$  诱导的针对肿瘤的免疫应答。TNF- $\alpha$  参与包括哮喘，II 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- $\alpha$  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- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  协同抗病毒作用。

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法检测样品中猪 TNF- $\alpha$  浓度。在猪 TNF- $\alpha$  单克隆抗体预包被酶标板中加入适度稀释的样品和标准品，其中的 TNF- $\alpha$  会与其单抗结合，洗去游离成分；加入生物素化的抗猪 TNF- $\alpha$  抗体，抗猪 TNF- $\alpha$  抗体与结合在单抗上的猪 TNF- $\alpha$  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- $\alpha$ ，辣根过氧化物酶会使无色的显色剂出现蓝色；加终止液变为黄色。在 450 nm 下测 OD 值，猪 TNF- $\alpha$  浓度与 OD 450 值之间呈正比，可通过绘制标准曲线计算出样品中猪 TNF- $\alpha$  浓度。

## 使用方法

### 1. 样品准备

- (1) 细胞上清样品：4℃ 约 1000 ×g 离心 10 min 取上清。
- (2) 血清样品：使用不含热原和内毒素的试管收集血液，室温静置 30 min，4℃ 约 1000 ×g 离心 10 min 取黄色上清。
- (3) 血浆样品：使用 EDTA、柠檬酸盐、肝素作为抗凝剂收集血浆，4℃ 约 1000 ×g 离心 15 min 取黄色或淡黄色上清。

#### 注：

- a. 样品制备好后置于冰上待用。
- b. 若待测样品不能及时检测，样品制备好后可先进行分装，于 -20℃ 或 -80℃ 冻存，避免反复冻融。
- c. 室温（25℃-28℃）解冻，温度不可高于 37℃。
- d. 请勿使用溶血、高血脂或污染的样品检测。
- e. 如果血清中含有大量颗粒，检测前先离心或过滤去除。

f. 可根据实际情况，将样品做适当倍数稀释（可做预实验，以确定稀释倍数，正常猪血清或血浆样本建议做 1:2 稀释）。

### 2. 试剂准备

- (1) 试剂盒提前 30 min 从冰箱中取出，室温解冻。
- (2) 标准品：将 0.5 mL 标准稀释液加入冻干标准品中，静置 15 min，用移液枪轻轻吸打混匀，标准品浓度为 2000 pg/mL，根据需要进行稀释。

#### 标准品稀释方法

溶液	浓度 (pg/mL)	加入溶液 (μL)	标准品稀释液 (μL)
A (标准品)	2000	—	500
B	1000	250A	250
C	500	250B	250
D	250	250C	250
E	125	250D	250
F	62.5	250E	250
G	31.25	250F	250

(3) 生物素化抗体工作液：将浓缩生物素化抗体用生物素化抗体稀释液稀释 (1:100)，现配现用。

(4) 酶结合物工作液：将浓缩酶结合物用酶结合物稀释液稀释 (1:100)，现配现用。

(5) 洗涤缓冲液：将浓缩洗涤液用双蒸水稀释 (1:20)，若从冰箱中取出的浓缩洗涤液有结晶，可加热并轻轻摇晃使结晶溶解再进行配制，未用完的 4℃ 保存。

#### 注：

- a. 稀释后的标准品不可重复使用，未用完的标准品分装，于 -20℃ 或 -80℃ 冻存，避免反复冻融。
- b. 浓缩生物素化抗体、浓缩酶结合物稀释前请先离心处理，使管内液体沉入底部。
- c. 不同批号试剂不可混用。
- d. 混匀要充分，最好使用微量振荡器（用最低频率进行震荡）。

### 3. 操作步骤

(1) 根据待测样品和标准品的数量计算实验所需的预包被板条数，增加一孔作为对照。



(2) 分别将样品和不同浓度的标准品（每孔100 μL）加入相应的孔中，加入生物素化抗体工作液（50 μL/孔），用封板胶纸封住反应孔，室温孵育120分钟（空白对照孔除外）。充分混匀对反应结果尤为重要，要使用微量振荡器（最低频率700rpm）。

(3) 每孔注入350 μL 洗涤液进行洗板（自动洗板机注入与吸出间隔15-30 s，手工洗板静置30 s后甩尽液体），洗板4次，最后一次置于厚吸水纸上拍干。

(4) 将酶结合物工作液（每孔100 μL）加入相应的孔中，用封板胶纸封住反应孔，室温孵育30 min（空白对照孔除外），使用微量振荡器（最低频率700rpm）。

(5) 洗板4次（同上）。

(6) 加入显色剂（每孔100 μL），室温避光孵育10-20 min。

(7) 加入终止液（每孔100 μL），混匀后立即测量OD值。

（于450 nm处测量，操作时间在5 min以内。）

**注：**

- a. 每步使用新的封板胶纸，防止污染。
- b. 孵育温度和时间要适当，孵育时不可在变温环境中，时间不可过短，若标准曲线两点之间区别低，可适当延长底物孵育时间。
- c. 洗涤时每孔充满洗涤液，倾倒时迅速，洗涤酶标板应充分拍干，不要将吸水纸放入酶标反应孔中吸水。
- d. 整个实验应连续操作，不可间断，在实验开始前准备好样品和试剂。

**4. 结果分析**

(1) 每个标准品和样品的 OD 值应减去空白对照的 OD 值；

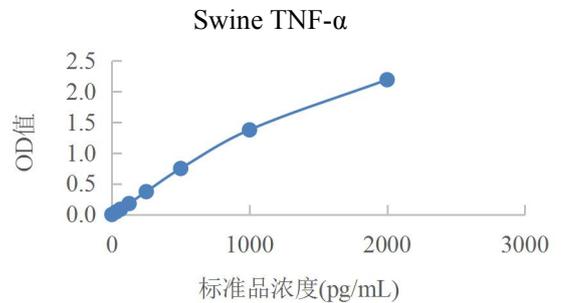
如果做复孔，差异范围在 20%以内有效，其平均值可作为测量值。

(2) 绘制标准曲线时，以标准品浓度为横坐标 (X)，OD 值为纵坐标 (Y)。样品的 TNF-α含量可通过样品 OD 值由标准曲线换算得出。

(3) 若样品 OD 值高于标准曲线上限，应适当稀释后重新测定，计算浓度时应乘以样品的稀释倍数。

**(4) 参考数据**

标准品浓度 (pg/mL)	OD 值 1	OD 值 2	平均值	矫正值
0	0.023	0.022	0.023	—
31.25	0.049	0.051	0.050	0.044
62.5	0.078	0.076	0.077	0.086
125	0.168	0.164	0.166	0.178
250	0.349	0.345	0.347	0.372
500	0.801	0.798	0.799	0.749
1000	1.350	1.346	1.348	1.377
2000	2.201	2.196	2.199	2.193



本图仅供参考，以同次试验结果所绘标准曲线为准



## 常见问题及解决方法

问题	原因	解决办法
无颜色	不同批号的试剂混合使用	重新检查试剂的标签，确保所有组分都属于同一批号。
	试剂配制、使用有误	重做试验，严格按说明书操作。
	HRP 酶污染了叠氮钠	使用新配制的试剂，禁含叠氮钠
颜色弱	产品超过有效期	检查产品有效期
	孵育时间过短	检查孵育时间
	使用的试剂被污染	检查试剂是否被污染
	洗涤操作不规范	检查洗涤是否充分，每孔是否有残留的洗液
		洗涤时，每孔完全充满洗涤缓冲液，倾出时要迅速
		检查或每孔加样量的体积是否准确
仪器设定不正确	检查仪器设定、滤光片的使用等是否正确	
背景过高	孵育温度和时间不适当	确定每一试验步骤的孵育温度和时间是否适当
	酶加量过多	加酶前验看移液器调节量是否准确
		检查稀释度，必要时进行效价测定
全部板子变成规则的蓝色	洗涤不充分，仍有残留物	检查每孔是否有残留的洗液
		使用洗板机充分洗涤
	酶结合物太多	检查稀释度，必要时进行效价测定
CV 值过高	封板膜、试剂容器被重复使用	使用新封板膜，每步使用不同的试剂容器
	操作不慎或洗涤不充分	严格按照说明书操作，特别是洗板步骤
	酶标板干板，未使用封板膜或封板膜重复使用	每两个步骤间酶标板保持湿润，每个步骤使用新的封板膜
标准曲线两点间差别低	移液器不准，吸头重复使用	检查并校准移液器，每次取样更换新的吸头
	酶结合物、检测抗体不足	检查稀释度，必要时进行效价测定
	板子显色不足	延长底物孵育时间
无期望的阳性信号	样品中无相应待检测物质	使用内参对照，或重复实验，重新考虑实验参数
	样品基质遮盖检测	对样品进行稀释
边缘效应	工作环境不均衡	孵育时避免在变温环境中进行
漂移	实验过程中短	整个实验应连续操作，不可间断，在实验开始前准备好样品和试剂
	试剂未按说明书平衡至室温	在正式进行实验操作前，所有试剂平衡至室温(除说明书中有其它要求外)

## 特异性

本试剂盒可定量检测天然和重组猪 TNF- $\alpha$ ，均不与下列细胞因子及蛋白发生反应。

重组人细胞因子	TNF- $\beta$ , GM-CSF, s TNF RI, s TNF RII, s TNF RII/Fc
重组小鼠细胞因子	TNF- $\alpha$ (truncayed), s TNF RI, s TNF RII IL-4

