

Mouse TNF- α ELISA 试剂盒

产品编号# CME0004 (48/96 孔)

适用于小鼠血清、血浆或细胞培养上清液等样本

仅供研究，不用于临床诊断。



客服热线: 400-7060-959 * 技术支持邮箱: tech@4abio.com
公司官网: www.4abio.net

目录

| | |
|------------------------------|--------|
| 简介 | - 3 - |
| 检测原理 | - 3 - |
| 试剂盒组分 | - 4 - |
| 储存条件 | - 5 - |
| 其他实验材料 (不提供, 但可协助购买) : | - 5 - |
| 注意事项 | - 5 - |
| 样本收集处理及保存方法 | - 6 - |
| 试剂准备 | - 6 - |
| 操作步骤 | - 8 - |
| 操作流程图 | - 8 - |
| 操作要点提示 | - 9 - |
| 结果判断 | - 9 - |
| 结果重复性 | - 10 - |
| 灵敏度 | - 10 - |
| 特异性 | - 10 - |
| 参考文献 | - 11 - |

 该产品由北京四正柏生物科技有限公司研制。

 请根据试剂盒中所附说明书指引进行实验。

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 。

小鼠的 TNF- α 基因长约 2.78kb, 由 4 个外显子和 3 个内含子组成。小鼠 TNF- α 前体含 235 个氨基酸残基, 信号肽为 79 氨基酸残基。成熟的小鼠 TNF- α 分子量为 17kDa, 由 156 个氨基酸残基组成, 第 69 位和 100 位两个半胱氨酸形成分子内二硫键, 有一个糖基化点, 但糖基化不影响其生物学功能。鼠与人的 TNF- α 有 79% 氨基酸组成同源性, TNF- α 的生物学作用无明显的种属特异性。

小鼠的 TNF- α 是由活化的巨噬细胞及其它类型的细胞, 包括 T 细胞和 B 细胞, NK 细胞, LAK 细胞, 星形胶质细胞, 内皮细胞, 平滑肌细胞和某些肿瘤细胞产生。

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增殖作用。

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髓过氧化物酶。

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。

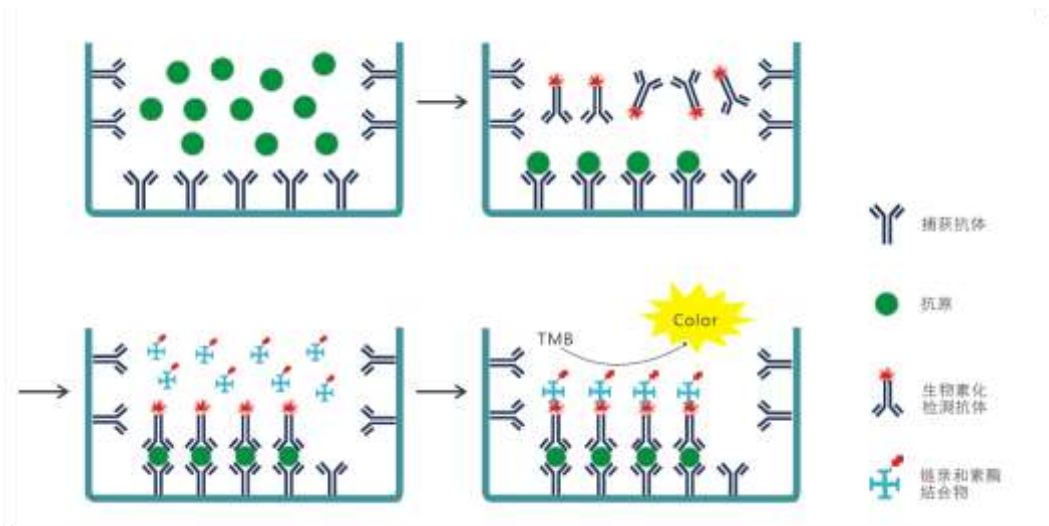
5) 促进髓样白血病细胞向巨噬细胞分化。

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 病毒转化淋巴母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。

检测原理

本实验采用双抗体夹心 ELISA。用抗小鼠 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; 加入生物素化的抗小鼠 TNF- α 抗体, 抗小鼠 TNF- α 抗体与结合在单抗上的小鼠 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。



检测原理示意图

试剂盒组分

| 试剂盒组分 | 96 孔 | 48 孔 | 配制 |
|----------------|------|------|-----------|
| 1a 标准品 | 2 支 | 1 支 | 按说明书进行稀释 |
| 1b 标准品和标本稀释液 | 1 瓶 | 1 瓶 | 即用型 |
| 2a 浓缩生物素化抗体 | 2 支 | 1 支 | 按瓶签标识进行稀释 |
| 2b 生物素化抗体稀释液 | 1 瓶 | 1 瓶 | 即用型 |
| 3a 浓缩酶结合物 (避光) | 2 支 | 1 支 | 按瓶签标识进行稀释 |
| 3b 酶结合物稀释液 | 1 瓶 | 1 瓶 | 即用型 |
| 4 浓缩洗涤液 20× | 1 瓶 | 1 瓶 | 按瓶签标识进行稀释 |
| 显色剂 (避光) | 1 瓶 | 1 瓶 | 即用型 |
| 终止液 | 1 瓶 | 1 瓶 | 即用型 |
| 抗体包被板条 | 8×12 | 8×6 | 即用型 |
| 封板胶纸 | 4 张 | 2 张 | 即用型 |
| 说明书 | 1 份 | 1 份 | |

如果您收到试剂盒后发现上表中有任何组分破损或缺失,请及时联系我司客服 400-7060-959 或 tech@4abio.com。我们将及时为您解决相关问题。

储存条件

| | | |
|-------------|------------------------------|---|
| 未启封的试剂盒 | 4℃保存，请于保质期内使用。 | |
| 已启封或重新溶解的试剂 | 1b 标准品和标本稀释液 | 可以整盒放入 4℃储存 1 个月。 2a 浓缩生物素化抗体和 3a 浓缩酶结合物需现用现配。 |
| | 2a 浓缩生物素化抗体 (100×) | |
| | 2b 生物素化抗体稀释液 | |
| | 3a 浓缩酶结合物 (避光 100×) | |
| | 3b 酶结合物稀释液 | |
| | 4 浓缩洗涤液 20× | |
| | 显色剂 (避光) | |
| | 终止液 | 4℃或常温保存 |
| | 标准品 | 重溶后分装，-20℃存放一个月，避免反复冻融。稀释后的标准品使用后应丢弃，不得重复使用。 |
| 抗体包被板条 | 实验中不用的板条应立即放回包装袋中，密封干燥 4℃保存。 | |

以上储存条件均要求在试剂盒保质期内。

其他实验材料 (不提供，但可协助购买)：

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℃温箱
5. 双蒸水或去离子水
6. 坐标纸
7. 量筒

注意事项

1. 试剂盒保存在2-8℃，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(2a)、浓缩酶结合物(3a)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. 为避免交叉污染请使用一次性吸头。
4. 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。
5. 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。

6. 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。
7. 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份不能混用，请在有效日期内使用本产品。
8. 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。
9. 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)。
10. 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。
11. 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。
12. 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。
13. 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。

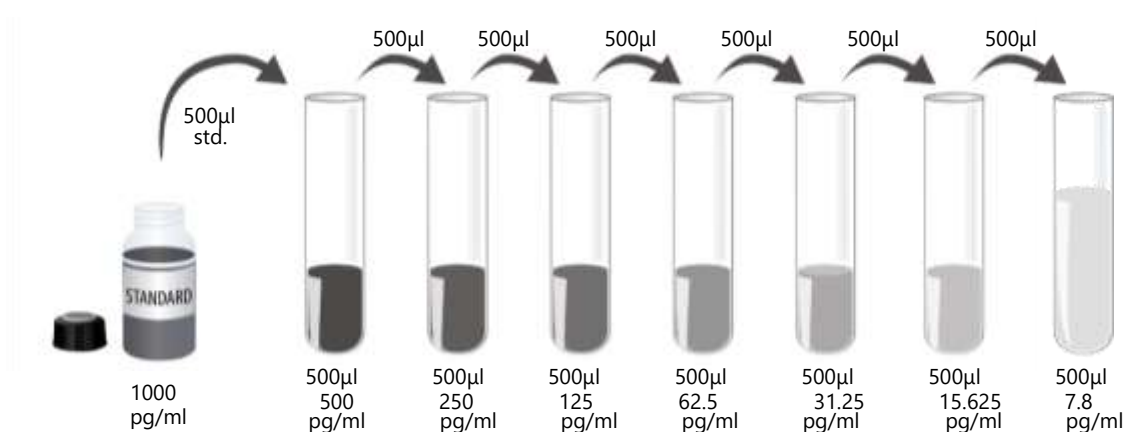
样本收集处理及保存方法

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℃-70℃保存，避免反复冻融。尽量避免使用溶血或高脂样本。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℃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：正常小鼠血清或血浆样本建议做1:2稀释。

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℃。
3. **标准品**：加入标准品/标本稀释液(1b)1.0ml至冻干标准品(1a)中，待彻底溶解后，静置15分钟混匀(浓度为1000pg/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：500、250、125、62.5、31.25、15.625、7.8125、0 pg/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℃贮存，一次性使用，避免反复冻融。

标准品稀释方法：



4. **生物素化抗体工作液：**根据每孔需要50µl来计算总的用量，多配制50-100µl。以生物素化抗体稀释液(2b)稀释浓缩生物素化抗体(2a)(1:100)。最好现用现配。（稀释方法参照下表）

| 所用板条数 | 浓缩生物素化抗体 | 生物素化抗体稀释液 |
|-------|----------|-----------|
| 12 | 55µL | + 5445µL |
| 10 | 45µL | + 4455µL |
| 8 | 35µL | + 3465µL |
| 6 | 25µL | + 2475µL |
| 4 | 17µL | + 1683µL |
| 2 | 9µL | + 891µL |
| 1 | 4.5µL | + 445.5µL |

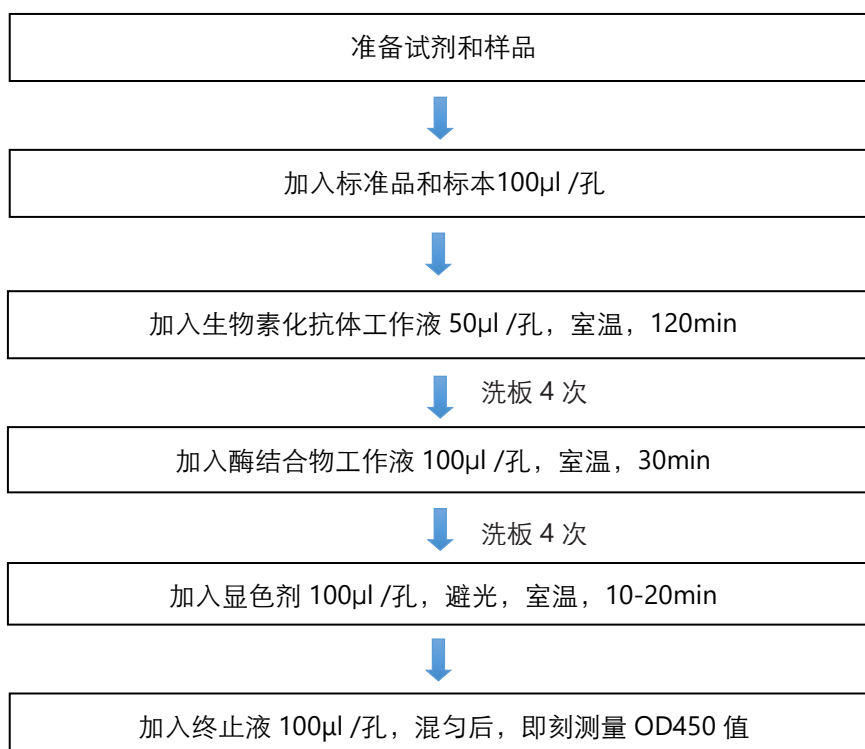
5. **酶结合物工作液：**以酶结合物稀释液(3b) 稀释浓缩酶结合物(3a)(1:100)。最好现用现配。（稀释方法参照下表）

| 所用板条数 | 浓缩酶结合物 | 酶结合物稀释液 |
|-------|--------|-----------|
| 12 | 110µL | + 10890µL |
| 10 | 90µL | + 8910µL |
| 8 | 70µL | + 6930µL |
| 6 | 50µL | + 4950µL |
| 4 | 33µL | + 3267µL |
| 2 | 17µL | + 1683µL |
| 1 | 9µL | + 891µL |

操作步骤

1. 按照上述准备工作配制好各种溶液。
2. 根据待测样品数量和标准品的数量决定所需的板条数，并增加1孔作为空白对照孔。分别将标本和不同浓度标准品(100 μ l /孔)加入相应孔中，加入生物素化抗体工作液(50 μ l /孔)。用封板胶纸封住反应孔（零孔只加标准品/样本稀释液），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. 洗板4次：(1)自动洗板机：要求注入的洗涤液为350 μ l，注入与吸出间隔15-30秒。(2)手工洗板：甩尽孔内液体，每孔加洗涤液350 μ l，静置30秒后甩尽液体，在厚迭吸水纸上拍干。
4. 加入酶结合物工作液(100 μ l /孔)。用封板胶纸封住反应孔，室温孵育30分钟（空白对照孔除外）。使用微量振荡器(使用最低频率700rpm)。
5. 洗板4次。
6. 加入显色剂100 μ l /孔，避光，室温孵育10-20分钟。
7. 加入终止液100 μ l /孔，混匀后即刻测量OD450值(5分钟内)。

操作流程



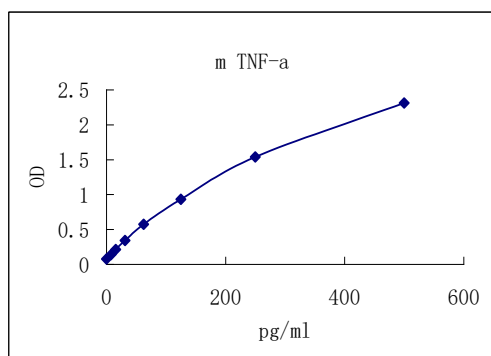
操作要点提示

1. 配制各种试剂时要充分混匀，但要避免产生大量泡沫，以免加样时加入大量的气泡，产生加样误差。
2. 为避免交叉污染，在加入不同浓度的标准品、不同样品、不同试剂时谨记及时更换吸头。
3. 为了确保准确的结果，在每次孵育前均需使用新封板胶纸封住反应孔。
4. 显色剂在添加之前，应保持无色，请勿使用已变为蓝色的显色溶液。最佳显色时间对标准曲线很重要，肉眼可见前 3-4 孔有梯度蓝色，后 3-4 孔差别不明显，零孔无蓝色出现即可终止。
5. 每次检测均要做标准曲线，根据样品待测因子的含量，适当稀释或浓缩样本，最好做预实验。

结果判断

1. 每个标准品和标本的OD值应减去空白孔的OD值，如果做复孔，求其平均值。
2. 使用计算机软件以吸光度OD值为纵坐标(Y)，相应的TNF- α 标准品浓度为横坐标(X)，生成相应的标准曲线，样品的TNF- α 含量可根据其OD值由标准曲线换算出相应的浓度。
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算标本含量。
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 | 0.078 | 0.073 | 0.076 | — |
| 7.8125 | 0.136 | 0.141 | 0.139 | 0.157 |
| 15.625 | 0.217 | 0.209 | 0.213 | 0.213 |
| 31.25 | 0.341 | 0.340 | 0.341 | 0.323 |
| 62.5 | 0.567 | 0.579 | 0.573 | 0.535 |
| 125 | 0.937 | 0.927 | 0.932 | 0.923 |
| 250 | 1.535 | 1.542 | 1.539 | 1.565 |
| 500 | 2.313 | 2.306 | 2.310 | 2.305 |



本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线为准

结果重复性

板间，板内变异系数均<10%。

灵敏度

最低检测小鼠 TNF- α 剂量小于 3.9pg/ml。 最低检出量测定方法：20 个零标准的平均 OD 值增加两个标准差，再计算相应的浓度。

特异性

此试剂盒可检测天然和重组的小鼠TNF- α ，以50ng/ml平行做特异性试验，均不与下列细胞因子及蛋白反应。

| 重组人细胞因子 | 重组小鼠细胞因子 | 其他蛋白 |
|---------------|---------------|---------------|
| TNF- α | G-CSF | TNF- α |
| TNF sRI | GM-CSF | |
| TNF sRII | C10 | |
| | IFN- γ | |
| | IL-1 α | |
| | IL-1 β | |
| | IL-2 | |
| | IL-3 | |
| | IL-5 | |
| | IL-6 | |
| | IL-7 | |
| | IL-9 | |
| | LIF | |
| | M-CSF | |
| | SCF | |
| | VEGF | |
| | TNF-beta | |

参考文献

1. Pennica, D. et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6060.
2. Vilcek J. and T.H. Lee (1991) J. Biol. Chem. 266:7313.
3. Ruddle, N.H. (1992) Curr. Opinion Immunol. 4:327.
4. Tumor Necrosis Factor: Structure, Function and Mechanism of Action, Aggarwal, B.B. and J. Vilcek eds. (1991) Marcel Dekker, Inc., New York.
5. Beutler, B. and A. Cerami (1989) Annu. Rev. Immunol. 7:625.
6. Kwon, B. et al. (1999) Curr. Opin. Immunol. 11:340.
7. Idriss, H.T. and J.H. Naismith (2000) Microsc. Res. Tech. 50:184.
8. Sedgwick, J.D. et al. (2000) Immunol. Today 21:110.
9. Thomas, P.S. (2001) Immunol. Cell Biol. 79:132.
10. Saltiel, A.R. et al. (2001) Cell 104:517.
11. D' Haens, G. (2003) Curr. Pharm. Des. 9:289.
12. Feldmann, M. and R.N. Maini (2001) Annu. Rev. Immunol. 19:163.