



ClinMax™ 人 TNF-alpha 快速ELISA试剂盒

货号: CEA-C246

规格: 96 tests

本试剂盒仅用于科研使用，不可用于诊断或治疗应用。

重要提示：在进行实验前，请仔细阅读本用户指南。

产品信息

本试剂盒用于定量检测生物样本（细胞上清、血清、血浆）中人 TNF-alpha 的浓度。

本试剂盒的测定原理采用定量夹心酶联免疫分析法。首先在微孔板上包被捕获抗体，然后将待测样本加入孔中，样品中的待测抗原与捕获抗体结合。随后，加入另一个生物素标记的检测抗体，这个特异抗体与待测抗原的另一表位结合，从而形成“夹心”结构。最后，通过加入 Streptavidin-HRP 与生物素标记的检测抗体结合，使得酶标记物与夹心结构关联起来。添加适当的底物后，酶催化底物反应产生可测量的信号，从而定量检测待测抗原的含量。

注意事项：

本试剂盒仅供科研使用，不用于诊断或治疗应用。

请勿在试剂盒标签上指示的到期日期之后使用本试剂盒。

请勿将试剂与其他批次或来源的试剂混合或替换。

生产企业：百斯医学诊断科技（北京）有限公司

生产地址：北京经济技术开发区永昌北路 3 号永昌工业园 3 号楼 8106-8107

电话：010-67855298-8147

邮箱：IVD.AcroDiagnostics@acrobiosystems.com

销售企业：北京百普赛斯生物科技股份有限公司

地址：北京经济技术开发区宏达北路 8 号 5 号楼 4 层

电话：400-682-2521（全国） 010-53681107（北京）

邮箱：order.cn@acrobiosystems.com

试剂盒组分

该试剂盒包含足够的试剂用于96孔。

Catalog	Contents	Amount
CEA246-C01	Pre-coated Anti-TNF- α Antibody Microplate	1 plate
CEA246-C02	Human TNF- α Standard	12.5 ng \times 2
CEA246-C03	Biotin-Anti-TNF- α Antibody	20 μ g
CEA246-C04	Biotin-Antibody Dilution Buffer	8 mL
CEA246-C05	Streptavidin-HRP Con. Solution	500 μ L
CEA246-C06	Streptavidin-HRP Dilution Buffer	15 mL
CEA246-C07	20 \times Washing Buffer	50 mL
CEA246-C08	Sample Dilution Buffer	15 mL \times 2
CEA246-C09	Substrate Solution	12 mL
CEA246-C10	Stop Solution	6 mL

存储条件

将未开封的试剂盒存储在 2-8 $^{\circ}$ C 温度下。请避免在试剂盒的过期日期之后使用。对于已开封的试剂盒，除了微孔板和重构的标准品按照下表进行特殊存储，其余组分可在 2-8 $^{\circ}$ C 温度下保存 30 天。

Contents	Storage conditions
Pre-coated Anti-TNF- α Antibody Microplate	Return unused wells to the foil pouch, reseal along entire edge. May be stored for up to 1 month at 2-8 $^{\circ}$ C.
Human TNF- α Standard	Aliquot and store for up to 1 month at -70 $^{\circ}$ C in a freezer. Avoid repeated freeze-thaw cycles.
Biotin-Anti-TNF- α Antibody	Aliquot and store for up to 1 month at -70 $^{\circ}$ C in a freezer. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

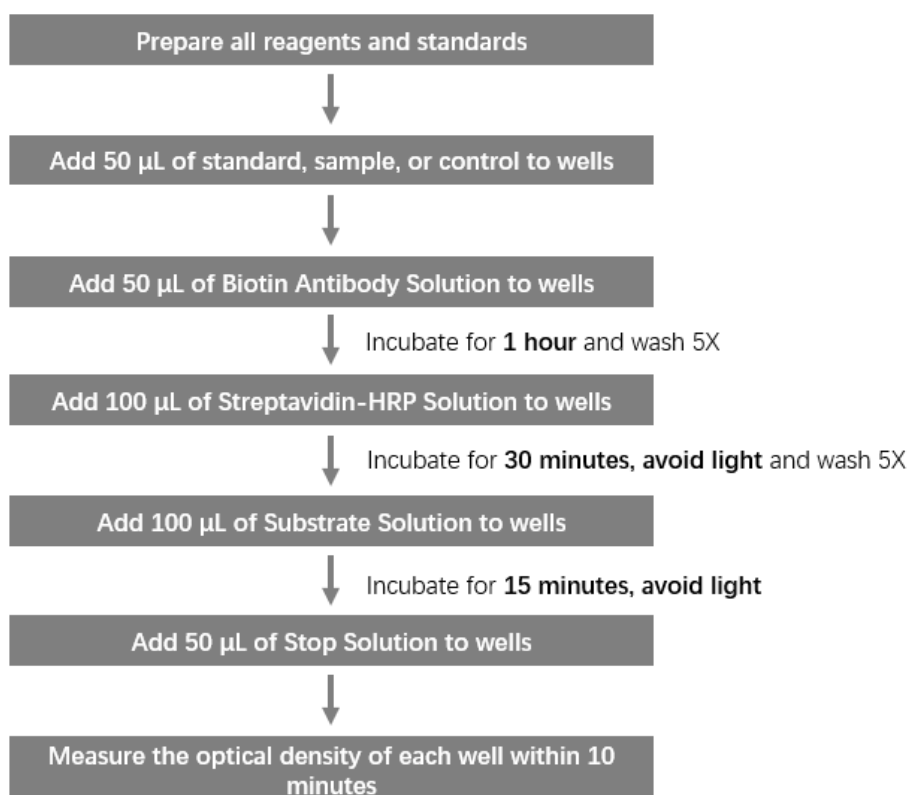
注意: *Streptavidin-HRP Con. Solution* 和 *Substrate Solution* 需避光保存。

需要但未提供的试剂/设备

设备	酶标仪
试剂	超纯水/去离子水/蒸馏水
耗材	50 mL 和 500 mL 量筒
	移液器和枪头
	用于稀释标准品的 EP 管

工作流程

Analyte: TNF- α



NOTE: Incubation temperature is 18 °C-25 °C

工作液和梯度标准品的制备

注意事项：使用前将所有试剂置于室温（18°C~25°C）。如果在缓冲溶液中形成晶体，请将试剂置于37°C培养箱中，直至晶体完全溶解，然后在使用前将溶液恢复至室温。

抗体储存液的重构

用 200 μL 超纯水将所提供的抗体（CEA246-C03）配制成储存液，在室温下溶解 15 至 30 分钟，轻轻吹吸混匀。重构后的 TNF- α 抗体储存液浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

备注：避免剧烈摇动或涡旋，分装后存储在 -70°C。分装规格不低于 10 μg 。避免反复冻融。

工作液的制备

1. 1 \times Washing Buffer: 用超纯水/去离子水/蒸馏水将 50 mL 20 \times Washing Buffer 稀释至 1000 mL。
2. Biotin Antibody Solution: 取 30 μL 抗体储存液加入 6 mL Biotin-Antibody Dilution Buffer, 轻轻摇匀, 现用现配。
3. Streptavidin-HRP Solution: 取 400 μL Streptavidin-HRP Con. Solution 加入 12 mL Streptavidin-HRP Dilution Buffer, 轻轻摇匀, 该工作液需避光保存, 现用现配。

标准品的重构

用 1 mL 超纯水将所提供的标准品（CEA246-C02）配制成储存液，在室温下溶解 15 至 30 分钟，轻轻吹吸混匀。重构后的 TNF- α 标准品储存液浓度为 12.5 ng/mL 。

备注：避免剧烈摇动或涡旋，分装后存储在 -70°C。避免反复冻融。

梯度标准品的制备

1. 将一个试管标记为“Std.-1”，取 100 μL 标准品储存液（12.5 ng/mL ）和 900 μL 样本稀释液（Sample Dilution Buffer）加入 Std.-1 的管中，作为标曲的最高点 Std.-1（1250 pg/mL ）轻轻振荡混匀；
2. 准备 6 个 EP 管，分别标记为 Std.-2, Std.-3, Std.-4, Std.-5, Std.-6, Std.-7；
3. 标准曲线配置如下：在 Std.-2 管中加入 500 μL Std.-1 溶液和 500 μL 样本稀释液，作为标曲的 Std.-2（625 pg/mL ）；
4. 后续按照此方法继续依次 1: 1 稀释至（312.5 pg/mL , 156.3 pg/mL , 78.1 pg/mL , 39.1 pg/mL , 19.5 pg/mL ），共配 6 个标准曲线浓度点；
5. 以样本稀释液作为标准曲线的零浓度。

实验流程：

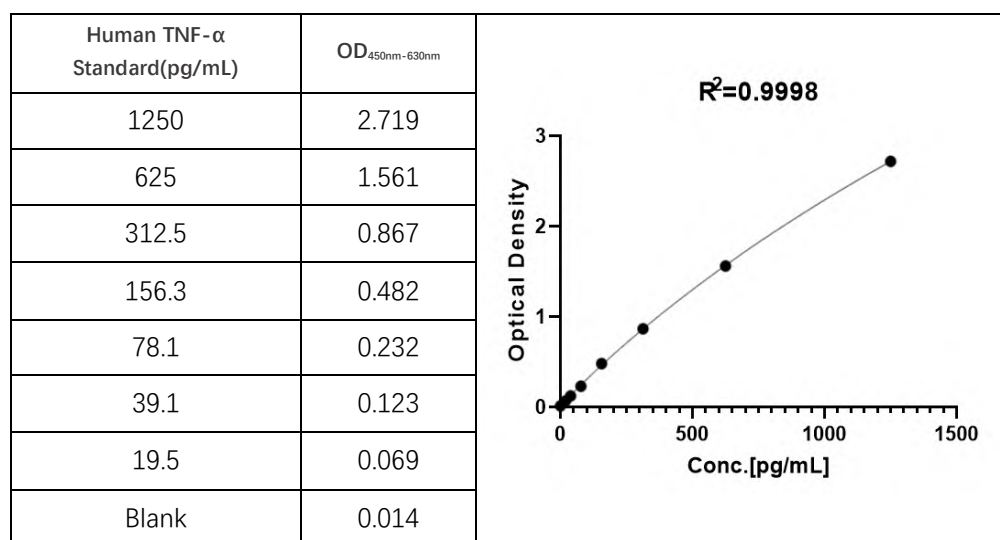
1. 向微孔板中加入 50 μL TNF- α Standards 或样品。
2. 向微孔板中加入 50 μL Biotin-Anti-TNF- α Antibody Solution。用密封膜密封微孔板，在室温（18 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$ ）下孵育 **1.0 小时**。
3. 吸出剩余溶液，向每孔中加入 300 μL 1 \times Washing Buffer，轻轻敲击板 1 分钟，去除任何剩余的 1 \times Washing Buffer：通过吸出或倾倒，倒置板并用纸巾吸干。重复上述洗涤步骤，总共五次。
4. 向微孔板中加入 100 μL Streptavidin-HRP Solution。用密封膜密封微孔板，在室温（18 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$ ）下孵育 **30 分钟，避光**。
5. 重复步骤 3。
6. 向微孔板中加入 100 μL Substrate Solution，用密封膜密封微孔板并在室温（18 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$ ）下孵育 **15 分钟，避光**。
7. 向微孔板中中加入 50 μL Stop Solution，轻轻敲击板以充分混合。终止反应后，**十分钟内上机读数**。
注意：孔中的颜色应从蓝色变为黄色。
8. 使用酶标仪测定读取 450nm 和 630nm 处的吸光度。
注意：为了减少背景噪音，用 450nm 读取的值减去 630nm 读取的值。

结果解读

1. 标准曲线的范围: $R^2 \geq 0.9900$ 。
2. 如果待测样品的 OD 值高于最高标准, 应将样品用稀释缓冲液稀释后重复测定。
3. 校准标准曲线得到的吸光度值, 以标准浓度为 x 轴, 校准吸光度值为 y 轴绘制标准曲线。四参数拟合用于绘制标准曲线并计算样品浓度。

典型数据

注意: For each experiment, a standard curve needs to be set for each microplate, and the specific OD value may vary depending on different laboratories, testers, or equipment. The following example data is for reference only. The sample concentration was calculated based on the results of the standard curve. .

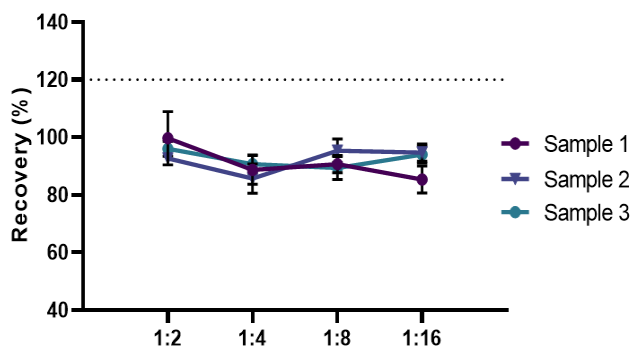


灵敏度

检测零浓度校准品 20 次, 得到 20 次测定结果的 OD 值, 计算其平均值 M 和标准差 SD, 将 $M+2SD$ 所对应的 OD 值, 带入标准曲线中, 计算得出对应的浓度, 即最低检测浓度(Minimum Detectable Concentration, MDC)。TNF- α 最低可检测限浓度小于 2.0 pg/mL。

稀释线性

将三份高值 TNF- α 样本加入到血清中，按 1:2、1:4、1:8、1:16 进行稀释，测定在线性范围内样品的值。从血清样本中平均可检测到 91.9% 的 TNF- α 蛋白。



批内精密度

同一批试剂中测试含有 3 个不同浓度的 TNF- α 样品，每个样本检测十次，批内精密性 CV < 10%。

Sample Concentration (pg/mL)	Mean (pg/mL)	SD	Numbers	CV (%)
500	491.17	19.12	10	3.9
100	100.91	7.30	10	7.2
30	31.48	1.60	10	5.1

批间精密度

对 3 个不同浓度的 TNF- α 样品进行 3 个批次测试，每批 3 个样本浓度、每个浓度检测 3 次，批间精密性 CV < 15%。

Sample Concentration (pg/mL)	Mean (pg/mL)	SD	Numbers	CV (%)
500	489.67	21.35	9	4.4
100	101.74	7.15	9	7.0
30	29.97	2.76	9	9.2

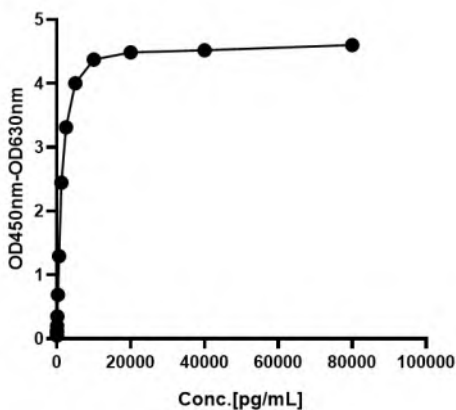
回收率

将 TNF- α 蛋白按照 1: 9 的稀释比例加标到 3 份人血清样品中，然后进行分析，回收率的计算公式= (加标样本值-Blank 样本值*0.9) /理论值 \times 100%。从血清样本中平均回收了 91.3%的 TNF- α 蛋白。

Sample ID	Conc Measured (pg/mL)	Conc Added (pg/mL)	Conc Recovered (pg/mL)	Recovery (%)
1	613.40	625.0	613.40	98.1
	281.80	312.5	281.80	90.2
	152.61	156.3	152.61	97.7
	74.15	78.1	74.15	94.9
	-	-		
2	581.92	625.0	581.92	93.1
	296.43	312.5	296.43	94.9
	135.44	156.3	135.44	86.7
	71.64	78.1	71.64	91.7
	-	-		
3	571.42	625.0	571.42	91.4
	268.88	312.5	268.88	86.0
	133.34	156.3	133.34	85.3
	66.66	78.1	66.66	85.3
	-	-		

Hook 效应

TNF- α 浓度高于 10 ng/ml 不影响检测结果。



真实样本值

人类外周血单核细胞 (PBMC) (1×10^6 细胞/mL) 在补充 10%胎牛血清的 RPMI 培养基中培养。细胞未刺激或用 10 μ g/mL 的 PHA 刺激培养 5 天。取出细胞培养上清液的样本并储存于 $\leq -20^\circ\text{C}$ ，直到检测。

Condition	Day 3 Mean (pg/mL)	Day 5 Mean (pg/mL)
Unstimulated	ND	ND
Stimulated with PHA	248	983

ND= Non-detectable

常见问题指南

问题	原因	解决方法
标准曲线差	* 移液不准确	* 检查移液器
CV 值偏高	* 移液不准确 * 孔中有气泡	* 检查移液器 * 去除孔中的气泡
背景高	* 板子清洗不充分 * 洗涤缓冲液被污染	* 按操作步骤正确清洗 * 制备新的洗涤缓冲液
整板读数偏低	* 波长选择错误 * 孵育时间不足	* 检查波长参数 * 增加孵育时间
标准曲线正常，样品读值高	* 样本中的细胞因子水平高于检测范围	* 稀释样本再次进行检测
曲线漂移	* 加样时间过长 * 试剂不在室温下	* 在检测开始之前准备好所有的标准品和样品，尽量控制加样时间 * 除非抗体等物质有特殊说明，否则在加样前所有试剂都处于室温状态