

鱼肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 酶联免疫 (ELISA)

试剂盒使用说明书

本试剂仅供研究使用，不得用于临床诊断

规格：48T/96T

实验目的：

本试剂盒用于测定鱼血清、血浆、组织匀浆及相关液体样本中肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的含量。

实验原理：

本试剂盒应用双抗体夹心法测定标本中鱼肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 水平。用纯化的鱼肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 抗体包被微孔板，制成固相抗体，往包被单抗的微孔中依次加入肿瘤坏死因子 α (TNF- α)，再与 HRP 标记的肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 抗体结合，形成抗体-抗原-酶标抗体复合物，经过彻底洗涤后加底物 TMB 显色。TMB 在 HRP 酶的催化下转化成蓝色，并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度 (OD 值)，通过标准曲线计算样品中鱼肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 浓度。

试剂盒组成：

试剂盒组成	48 孔配置	96 孔配置	保存
说明书	1 份	1 份	
封板膜	2 片	2 片	
密封袋	1 个	1 个	
酶标包被板	1×48	1×96	2-8℃ 保存
标准品：720 ng/L	0.5ml×1 瓶	0.5ml×1 瓶	2-8℃ 保存
标准品稀释液	1.5ml×1 瓶	1.5ml×1 瓶	2-8℃ 保存
酶标试剂	3 ml×1 瓶	6 ml×1 瓶	2-8℃ 保存
样品稀释液	3 ml×1 瓶	6 ml×1 瓶	2-8℃ 保存
显色剂 A 液	3 ml×1 瓶	6 ml×1 瓶	2-8℃ 保存
显色剂 B 液	3 ml×1 瓶	6 ml×1 瓶	2-8℃ 保存
终止液	3 ml×1 瓶	6 ml×1 瓶	2-8℃ 保存
浓缩洗涤液	(20ml×20 倍)×1 瓶	(20ml×30 倍)×1 瓶	2-8℃ 保存

注：标准品用标准品稀释液依次稀释为：360、180、90、45、22.5 ng/L。

样本处理及要求：

1. 血清：室温血液自然凝固 10-20 分钟，离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分）。仔细收集上清，保存过程中如出现沉淀，应再次离心。
2. 血浆：应根据标本的要求选择 EDTA 或柠檬酸钠作为抗凝剂，混合 10-20 分钟后，离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分）。仔细收集上清，保存过程中如有沉淀形成，应该再次离心。
3. 尿液：用无菌管收集，离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分）。仔细收集上清，保存过程中如有沉

淀形成，应再次离心。胸腹水、脑脊液参照实行。

4. 细胞培养上清：检测分泌性的成份时，用无菌管收集。离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分）。仔细收集上清。检测细胞内的成份时，用 PBS（PH7.2-7.4）稀释细胞悬液，细胞浓度达到 100 万/ml 左右。通过反复冻融，以使细胞破坏并放出细胞内成份。离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分）。仔细收集上清。保存过程中如有沉淀形成，应再次离心。
5. 组织标本：切割标本后，称取重量 1g，加入 9ml 的 PBS、PH7.4，匀浆的比例 1:9，匀浆液选取 PBS（PH=7.2-7.4，浓度为 0.01mol/L）。离心 20 分钟左右（3000-5000 转/分），仔细收集上清。
6. 不能检测含 NaN₃ 的样品，因 NaN₃ 抑制辣根过氧化物酶的（HRP）活性。

注：标本溶血会影响最后检测结果，因此溶血标本不宜进行此项检测。

需自备的仪器耗材：

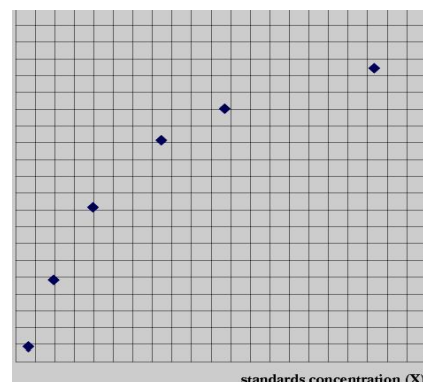
1. 酶标仪（450nm）
2. 高精度加样器及枪头：0.5-10uL、2-20uL、20-200uL、200-1000uL
3. 37℃恒温箱
4. 蒸馏水或去离子水

操作步骤：

- 1、加样：标准品设定 5 个浓度点 10 个孔，每个浓度设定平行孔，加入 50 μl 不同浓度的标准品，空白孔设定 1 个孔加入 50 μl 蒸馏水（空白对照孔不加样品及酶标试剂，其余各步操作相同）、待测样品孔，在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液 40 μl，然后再加待测样品 10 μl（样品最终稀释度为 5 倍）。加样将样品加于酶标板孔底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀。
- 2、温育：用封板膜封板后置 37℃温育 30 分钟。
- 3、配液：将 30（48T 的 20 倍）倍浓缩洗涤液用蒸馏水 30（48T 的 20 倍）倍稀释后备用。
- 4、洗涤：小心揭掉封板膜，弃去液体，甩干，每孔加满洗涤液，静置 30 秒后弃去，如此重复 5 次，拍干。
- 5、加酶：每孔加入酶标试剂 50 μl，空白孔除外。
- 6、温育：操作同 2。
- 7、洗涤：操作同 4。
- 8、显色：每孔先加入显色剂 A50 μl，再加入显色剂 B50 μl，轻轻震荡混匀，37℃避光显色 15 分钟。
- 9、终止：每孔加终止液 50 μl，终止反应（此时蓝色立转黄色）。
- 10、测定：以空白孔调零，450nm 波长依序测量各孔的吸光度(OD 值)，测定应在加终止液后 15 分钟以内进行。

计算：

以标准物的浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，在坐标纸上绘出标准曲线，根据样品的 OD 值由标准曲线查出相应的浓度；再乘以稀释倍数；或用标准物的浓度与 OD 值计算出标准曲线的直线回归方程式，将样品的 OD 值代入方程式，计算出样品浓度，再乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。



试剂盒性能：

1. 样品线性回归与预期浓度相关系数 R 值为 0.98 以上。
2. 批内变异系数与批间变异系数应分别小于 10%和 15% 。

检测范围:

10 ng/L - 360 ng/L

灵敏度:

最低检测浓度小于 1 ng/L

保存条件及有效期:

1. 试剂盒保存: 2-8℃。
2. 有效期: 6 个月

注意事项:

1. 试剂盒从冷藏环境中取出应在室温平衡 15-30 分钟后方可使用, 酶标包被板开封后如未用完, 板条应装入密封袋中保存。样本在使用前也要在室温平衡 30 分钟。
2. 浓洗涤液可能会有结晶析出, 稀释时可在水浴中加温助溶, 洗涤时不影响结果。
3. 各步加样均应使用加样器, 并经常校对其准确性, 以避免试验误差。一次加样时间最好控制在 5 分钟内, 如标本数量多, 推荐使用排枪加样。封板膜只限一次性使用, 以避免交叉污染。
4. 请每次测定的同时做标准曲线, 最好做复孔。如标本中待测物质含量过高(样本 OD 值大于标准品孔第一孔的 OD 值), 请先用样品稀释液稀释一定倍数(n 倍)后再测定, 计算时请最后乘以总稀释倍数($\times n \times 5$)。
5. 本试剂不同批号组分不得混用, 底物请避光保存。
6. 严格按照说明书的操作进行, 试验结果判定必须以酶标仪读数为准。
7. 所有样品, 洗涤液和各种废弃物都应按传染物处理。

风险说明:

由于现有条件及科学技术水平尚不能对所有供货商提供的所有原料进行全面的鉴定与分析, 本产品可能存在一定的质量技术风险。

1. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及当时的实验环境密切相关, 请务必准备充足的标本备份。
2. 不同批次的同一产品可能会有少许差别, 如: 检测限、灵敏度以及显色时间等, 只有全部使用本试剂盒配套试剂才能保证检测效果, 不能混用其他制造商的产品。只有严格遵守本试剂盒内的说明书操作才会得到最佳的检测结果。
3. 本公司只对试剂盒本身负责, 不对因使用该试剂盒所造成的样本消耗负责, 请使用者使用前充分考虑到样本的可能使用量, 预留充足的样本。
4. 若样本为细胞培养上清, 因该类样本干扰因素较多, 如: 细胞状态、细胞数量、采样时间等, 所以可能存在检测不出的情况。
5. 某些天然蛋白或重组蛋白, 包括原核及真核重组蛋白, 可能因为与本产品所使用的检测抗体及捕获抗体不匹配, 而不被检测出。
6. 试剂盒仅供研究使用, 不得用于临床实验或人体实验, 否则所产生的一切后果, 由实验者承担, 本公司概不负责。

武汉赛拓森生物科技有限公司

官网: www.stsbio.cn

电话: 13387575207 (微信同号)

QQ: 20308752