

Add&Read Human TNF alpha Quantitative Detection Kit

DD2704



使用说明书

Version 23.1

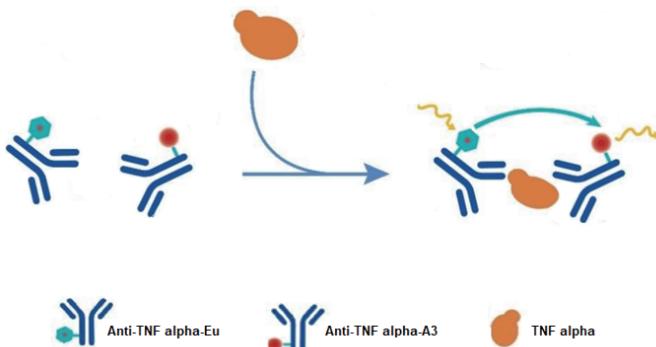
目录 Contents

01/产品概述	02
02/产品组分	02
03/保存条件及有效期	02
04/适用范围	03
05/自备材料	03
06/注意事项	03
07/实验流程	03
07-1/试剂配制	03
07-2/样品准备	04
07-3/反应体系	04
08/数据处理	05
09/产品性能指标	05
09-1/灵敏度	05
09-2/精密度	05
09-3/准确度	06
09-4/特异性	06
09-5/溯源	06

01/产品概述

肿瘤坏死因子α(TNF alpha)是一种主要由巨噬细胞和单核细胞产生的促炎细胞因子，能够直接杀伤肿瘤细胞而对正常细胞无明显毒性。TNF alpha在细胞内组装，形成一个非共价连接的同源三聚体，并在细胞表面表达。TNF alpha参与正常炎症反应和免疫反应，可以通过协同调节其它细胞因子的产生、细胞存活和死亡来协调组织的稳态。

本试剂盒采用夹心法检测TNF alpha含量，试剂盒中有TNF alpha Standard以及两株特异性识别TNF alpha的单克隆抗体，其中一株抗体偶联Eu(供体，Anti-TNF alpha-Eu)，另一株抗体偶联A3(受体，Anti-TNF alpha-A3)。当两株抗体同时与TNF alpha结合时，Anti-TNF alpha-Eu和Anti-TNF alpha-A3距离靠近，可发生荧光共振能量转移(FRET)。使用320 nm的激发光激发荧光供体，供体发射620 nm的光，此620 nm的光激发荧光受体，受体发射出665 nm的光。样本中待测TNF alpha浓度与FRET信号值(665 nm/620 nm的光强度比值)成正比。



02/产品组分

组分	DD2704-01(96 tests)	DD2704-02(500 tests)	DD2704-03(10,000 tests)
TNF alpha Standard (Lyophilized)	1 Vial	2 Vial	4 Vial
Anti-TNF alpha-Eu (20 ×)	12 µl	50 µl	1 ml
Anti-TNF alpha-A3 (20 ×)	12 µl	50 µl	1 ml
Detection Buffer	500 µl	3 ml	50 ml
Diluent Buffer	1 ml × 2	5 ml	100 ml
说明书	1册	1册	1册

03/保存条件及有效期

试剂盒于-30 ~ -15°C保存，≤0°C运输；避免强光直射，有效期12个月。

04/适用范围

细胞上清

05/自备材料

96/384浅孔板

酶标仪(配置HTRF/TR-FRET模块)

06/注意事项

1. Anti-TNF alpha-Eu (20 ×)与Anti-TNF alpha-A3 (20 ×)建议在储存液条件下(20 ×)分装于-30 ~ -15°C保存，避免反复冻融，分装体积建议不低于10 μl。
2. 重悬后的TNF alpha Std建议在-85 ~ -65°C保存，避免反复冻融。
3. 若Detection Buffer和Diluent Buffer出现少许沉淀属于正常现象，可采用室温涡旋或37°C水浴溶解后正常使用，解冻的Detection Buffer和Diluent Buffer可在2 ~ 8°C保存。
4. 为了在第一次使用本试剂盒时检查您的检测缓冲液是否有潜在的干扰效应，我们建议使用您自己的培养基和稀释剂平行制备校准曲线。
5. 加样品时，避免产生气泡。

07/实验流程

07-1/试剂配制

1. Anti-TNF alpha-Eu 和Anti-TNF alpha-A3工作液配制(储存液为20 ×)

96/384浅孔板的反应体积为20 μl，建议每20 μl体系各加入2 μl Anti-TNF alpha-Eu和2 μl Anti-TNF alpha-A3的工作液。在配制之前计算所需的将Anti-TNF alpha-Eu (20 ×)和Anti-TNF alpha-A3 (20 ×)的体积： $V=(\text{制样孔数} \times 2 / 20) \mu l$ 。

▲计算制样孔数时应将移液损失考虑进去，一般建议：制样孔数=实际检测孔数×110%。

Anti-TNF alpha-Eu工作液配制：

- 将Anti-TNF alpha-Eu (20 ×)从冰箱中取出，室温放置使其溶解，充分混匀后使用。
- 取1体积的将Anti-TNF alpha-Eu (20 ×) (1V μl)，加入到19体积Detection Buffer中 (19V μl)，混合均匀，备用。

Anti-TNF alpha-A3工作液配制：

- 将Anti-TNF alpha-A3 (20 ×)从冰箱中取出，室温放置使其溶解，充分混匀后使用。
- 取1体积的Anti-TNF alpha-A3 (20 ×) (1V μl)，加入到19体积Detection Buffer中 (19V μl)，混合均匀，备用。

▲Anti-TNF alpha-Eu (20 ×)与Anti-TNF alpha-A3 (20 ×)建议分装于-30 ~ -15°C保存，避免反复冻融。

2. Standard配制

96/384浅孔板的反应体系为20 μl/孔，每一个孔需要Standard 16 μl，在配制之前计算所需的Standard体积。

- 将TNF alpha Standard (Lyophilized)从冰箱中取出恢复至室温，用200 μl去离子水或蒸馏水重悬TNF alpha Standard (Lyophilized)，使其充分溶解，获得TNF alpha Std。
- 可参考下表进行Standard梯度稀释，以下表各梯度体积进行Diluent Buffer的分装。
- 取50 μl 溶解后的TNF alpha Std，加入到100 μl Diluent Buffer中，混合均匀，获得Std 7。
- 取50 μl Std 7，加入到105 μl Diluent Buffer中，混合均匀，获得Std 6。
- 以同样方式3.1倍稀释，获得Std 5-Std 1。

Standard	稀释方式	Standard浓度 pg/ml
Std 7	50 μl TNF alpha Std + 100 μl Diluent Buffer	32000
Std 6	50 μl Std 7 + 105 μl Diluent Buffer	10323
Std 5	50 μl Std 6 + 105 μl Diluent Buffer	3330
Std 4	50 μl Std 5 + 105 μl Diluent Buffer	1074
Std 3	50 μl Std 4 + 105 μl Diluent Buffer	346
Std 2	50 μl Std 3 + 105 μl Diluent Buffer	112
Std 1	50 μl Std 2 + 105 μl Diluent Buffer	36
Std 0	105 μl Diluent Buffer	0

▲ 重悬后的TNF alpha Std分装于-85 ~ -65°C保存，避免反复冻融。

07-2/样品准备

待检测样品用Diluent Buffer稀释3倍后检测。

▲若样品使用培养基稀释，则对应校准曲线也需用培养基配制。

07-3/反应体系

1.加样

96/384浅孔板反应体积为20 μl，按照下表实验分组及反应体系进行样品加样。

	Standard/样品	阴性对照
Standard/样品	16 μl	-
Anti-TNF alpha-Eu	2 μl	2 μl
Anti-TNF alpha-A3	2 μl	2 μl
Diluent Buffer	-	16 μl
Detection Buffer	-	-

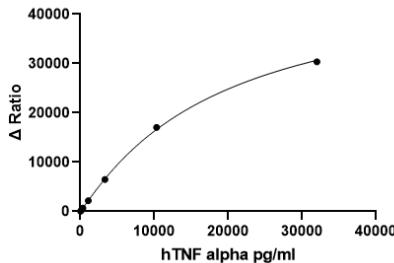
2. 试剂添加顺序为：

- 向反应体系(96/384浅孔板)中加入16 μl Standard/样品。
- 将Anti-TNF alpha-Eu工作液和Anti-TNF alpha-A3工作液以体积1:1混合均匀后，向反应体系中加入4 μl，用移液器在加样孔内轻柔吹打两次混匀。
- 3. 室温或者25°C条件下，孵育2 h，用酶标仪(配置HTRF/TR-FRET模块)检测，激发光为320 nm，检测两个波长(665 nm和620 nm)的发射光。

08/数据处理

- 将665 nm荧光值除以620 nm荧光值，把得到的值再乘以 10^4 ，获得Ratio值($665 / 620 * 10^4$)。
- 将各孔Ratio值减去Standard 0孔Ratio值，获得 Δ Ratio值。
- 以TNF alpha浓度为横坐标， Δ Ratio值为纵坐标，进行4参数拟合(加权 $1/y^2$)。
▲添加 $1/y^2$ 对等式对数据进行加权，最终成为4PL $1/y^2$ 拟合。 $1/y^2$ 加权校正是考虑到随着信号的增加而发生的方差变化，加权后提高了校准曲线在低/高浓度的精度。
- 将样品的 Δ Ratio值代入校准曲线的拟合方程式，计算出样品浓度，乘以稀释倍数即为样品的实际浓度，若样本 Δ Ratio值超过校准曲线的 Δ Ratio值范围，需调整稀释倍数后再进行检测。此校准曲线仅用于示范，每次实验均应生成新的校准曲线。

	TNF alpha(pg/ml)	Ratio	Δ Ratio	CV (%)
Standard 7	32000	30765	30366	0%
Standard 6	10323	17460	17061	2%
Standard 5	3330	6872	6472	3%
Standard 4	1074	2598	2198	0%
Standard 3	346	1086	690	1%
Standard 2	112	611	211	1%
Standard 1	36	464	65	4%
Standard 0	0	399	0	4%



09/产品性能指标

09-1/灵敏度

重复测定Standard 0 20次来确定检测限，重复测定Standard 1 20次来确定定量限。

	Diluent	DMEM	RPMI
检测限(LOD)	25 pg/ml	19 pg/ml	23 pg/ml
定量限(LOQ)	36 pg/ml	36 pg/ml	36 pg/ml

09-2/精密度

本试剂盒利用5个已知浓度的质控品在同一酶标板上重复测定3次，以评估分析内精密度。利用5个已知浓度的质控品由两名技术人员进行6个独立的分析批进行测定，以评估分析间精密度。

分析内精密度				
样品	n	测得平均浓度(pg/ml)	SD	CV
定量上限浓度样品	3	27818	1362	5%
高浓度样品	3	23955	393	2%
中浓度样品	3	13317	198	1%
低浓度样品	3	94	5	6%
定量下限浓度样品	3	32	1	4%

分析间精密度				
样品	n	测得平均浓度(pg/ml)	SD	CV
定量上限浓度样品	6	27603	1053	4%
高浓度样品	6	23419	1057	5%
中浓度样品	6	13230	568	4%
低浓度样品	6	94	8	9%
定量下限浓度样品	6	30	5	17%

09-3/准确度

本试剂盒利用5个已知浓度的质控品在同一酶标板上重复测定3次，以测定浓度与理论浓度比值来评估准确度。

样品	测得浓度(pg/ml)	测得平均浓度(pg/ml)	准确度	准确度范围%
	28454			
定量上限浓度样品	28746	27818	87	82 - 90
	26255			
	24039			
高浓度样品	24299	23955	100	98 - 101
	23527			
	13173			
中浓度样品	13235	13317	104	103 - 106
	13542			
	96			
低浓度样品	87	94	94	87 - 96
	97			
	31			
定量下限浓度样品	31	32	89	87 - 93
	33			

09-4/特异性

本试剂盒可识别天然和重组的人TNF alpha。对下面列出的因子进行特异性测定，未观察到明显的交叉反应。

人			
IL1 beta	IL8	IL10	IL2
CXCL-10	IFN gamma	GM-CSF	IL6

09-5/溯源

NIBSC/WHO (12/154) approximate value (IU/mL) = 0.1 × Human TNF alpha value (pg/mL)。



Nanjing Vazyme Biotech Co.,Ltd.

Web: www.vazyme.com

Tel: +86-400-600-9335

Sales: sales@vazyme.com

Support: support@vazyme.com

