



## 肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )含量检测实验报告

### 一、实验器材及试剂

#### 1、实验器材

名称	厂家	型号
立式冷藏柜	海尔	SC-332
电子天平	幸运	FA2204
S10 手持式高速匀浆机	上海菲桐仪器有限公司	S202404047
台式高速冷冻离心机	湖南恒诺仪器设备有限公司	2-16R
干式恒温器	申花	SH-G100
实验室超纯水机	砾鼎	MT-VF-20
涡旋混匀仪	JOANLAB	VM-500S
复合转子离心机	申花	SH-Mini7KS
酶标仪	ThermoFisher	Multiskan FC

#### 2、主要实验试剂

试剂名称	厂家	货号
1.5mL 离心管	科兔生物	KTL-15-P
5ml 离心管	科兔生物	KTL-50-P
50ml 尖底离心管	科兔生物	KTL-500-P
200 $\mu$ L 吸头	科兔生物	KTX-H200-W
1000 $\mu$ L 吸头	科兔生物	KTX-H1000-W
1250 $\mu$ L 吸头	科兔生物	KTX-H1200-W
单道移液枪 2-20 $\mu$ L	科兔生物	KTY-20
单道移液枪 5-50 $\mu$ L	科兔生物	KTY-50
单道移液枪 10-100 $\mu$ L	科兔生物	KTY-100
单道移液枪 20-200 $\mu$ L	科兔生物	KTY-200
单道移液枪 100-1000 $\mu$ L	科兔生物	KTY-1000



## 二、实验步骤

**试剂盒：大鼠肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )含量检测试剂盒**

**货号：m1002859**

### 1. 样本处理：

使用血清分离管，使样品在室温下凝结 30 分钟，然后在 1000 $\times$ g 下离心 15 分钟。立即取出血清并进行测定或等分装样品，将样品储存在 $\leq$ -20 $^{\circ}$ C 的温度下。避免重复冻融循环。

### 2. 试剂准备

(1) 使用前将所有试剂置于室温平衡 30 分钟左右。

(2) 洗涤液/稀释液配置：如果洗涤液/稀释液（20 $\times$ ）有晶体析出，需在 37 $^{\circ}$ C 下加热至晶体全部溶解。用蒸馏水 1:20 稀释（例如：1mL 浓缩洗涤液加入 19mL 的蒸馏水）。

(3) 标准品配置：试剂盒中取出标准品，准备 7 个试管，先从 20ng/mL 标准品（200 $\mu$ L）按需吸取一定量用 1 $\times$ 稀释液稀释 1000pg/mL，随后在 6 个试管中分别加入 500 $\mu$ L 的 1 $\times$ 稀释液，在这 6 个单独的试管中 1000pg/mL 标准品依次 2 倍倍比稀释至 6 个梯度，共配制 7 个浓度的标准品，依次为：1000pg/mL、500pg/mL、250pg/mL、125pg/mL、62.5pg/mL、31.25pg/mL、15.625pg/mL、从最高浓度标准品溶液中吸取 500 $\mu$ L 标准品到下一个试管中，轻轻吹打混匀，以此类推进行标准品的倍比稀释，1 $\times$ 稀释液用作零浓度标准品(0ng/mL)。

(4) 抗体工作液配置：使用前 10 分钟，用 1 $\times$ 稀释液将 100 $\times$ 生物素化抗体稀释成 1 $\times$ 生物素化抗体工作液，根据所需用量配置。

(5) 酶结合物工作液配置：使用前 10 分钟，用 1 $\times$ 稀释液将 100 $\times$ SA-HRP 稀释成 1 $\times$ SA-HRP 工作液，根据所需用量配置。

### 3. 实验流程

(1) 酶标板准备：确定试验所需要的孔数，取下未使用的酶标条放回装有干燥剂的铝箔袋。

(2) 样本孵育：每孔分别加入 100 $\mu$ L 不同浓度的标准品以及预处理过的待测样品，盖上封板胶纸，37 $^{\circ}$ C 避光反应 1.5h。孵育结束后，每孔加入 300 $\mu$ L 1 $\times$ 洗涤缓冲液，轻轻晃动 30 秒，甩干并在纸上拍干，以这种方式清洗 3 次。

(3) 抗体孵育：每孔加入 100 $\mu$ L 生物素化抗体工作液，轻轻混匀，盖上封板胶纸，37 $^{\circ}$ C 避光反应 1h。孵育结束后，重复步骤 2 中的清洗方式清洗 4 次。

(4) 酶标孵育：每孔加入 100 $\mu$ L 1 $\times$ SA-HRP 工作液，盖上封板胶纸，37 $^{\circ}$ C 避光反应 30 分钟，清洗 4 次，拍干。



(5) 底物显色：每孔首先加入 50 $\mu$ L 显色液 A，随后加入 50 $\mu$ L 显色液 B，轻轻混匀，盖上封板胶纸，37 $^{\circ}$ C 避光反应 15 分钟。（根据样品和对照抗体的颜色，自行控制显色时间）。

(6) 终止反应：待显色反应结束后，每孔加入 50 $\mu$ L 终止液，轻轻混匀，5 分钟内用预热完成的酶标仪在 450nm 处测吸光值。

#### 4. 结果计算

计算标准品和样本复孔的平均 OD 值并减去空白孔的 OD 值作为校正值。以浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，在坐标纸上绘出四参数逻辑函数的标准曲线（作图时去掉空白组的值）。或者使用能够生成四参数逻辑（4-P）曲线拟合的计算机软件来创建标准曲线。

若样品 OD 值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测并在计算样本浓度时乘以相应的稀释倍数。

计算出各样本 TNF- $\alpha$  含量，以 EXCLE 表发送结果。

仅供科研用途，不可用于临床诊断！