

小鼠TGF-beta1双抗夹心ELISA检测试剂盒

请在实验前仔细阅读本说明书

产品货号: KE10005
规格: 96T
灵敏度: 16.0 pg/mL
检测范围: 31.25 - 2000 pg/mL
用途: 此试剂盒用于定量检测血清、血浆以及细胞上清中小鼠TGF-beta1浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

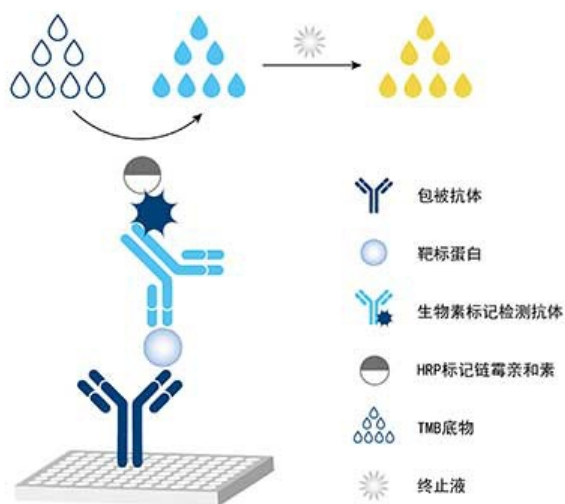
目录

一：背景信息	3
二：检测原理	3
三：需自备的实验器材	3
四：试剂盒组分及储存	4
五：实验注意事项	4
六：样本准备	4
七：试剂准备	5
八：实验步骤	6
九：实验参数	7
9.1 参考标曲图	7
9.2 精密度	7
9.3 加标回收率	8
9.4 样本值	8
9.5 灵敏度	8
9.6 线性	9
十：参考文献	9

一：背景信息

TGF- β 是细胞因子的转化生长因子 β (TGFB) 家族的成员，它是一种多功能肽，可在许多细胞类型中调节增殖、分化、粘附、迁移和其他功能。TGF- β 由多种细胞类型产生，包括调节性 T 细胞、成纤维细胞、上皮细胞和内皮细胞。TGF- β 与 TGFA 协同作用诱导转化。它还充当负分泌生长因子。TGF- β 在骨重塑中起着重要作用，因为它是成骨细胞骨形成的有效刺激剂，可导致定型成骨细胞的趋化性、增殖和分化。缺乏 TGF- β 的小鼠会患上严重的多灶性炎症、卵黄囊缺陷和结肠癌。

二：检测原理



◀双抗夹心模式图 (检测抗体标记生物素)

按操作顺序形成抗体夹心结构后，加入TMB底物，板孔液体由无色变成蓝色，再加入终止液液体变为黄色后进行吸光度值测定。

三：需自备的实验器材

- 3.1 酶标仪 (可读取450 nm和630 nm双波长);
- 3.2 高精度移液器及一次性移液器枪头;
- 3.3 洗板机 (亦可手动洗板);
- 3.4 EP管 (用于稀释标准品及样本);
- 3.5 吸水毛巾或滤纸 (用于拍干);
- 3.6 烧杯和量筒;
- 3.7 用于ELISA实验的数据分析的统计拟合软件 (推荐四参数拟合方法), 如: Origin, ELISA Calc等。

四：试剂盒组分及储存

英文名称	中文名称	规格	数量
Microplate	预包被酶标板 - 96孔板	8孔 × 12条	1 块
Protein standard	标准品 - 冻干粉状 *	4000 pg/瓶	2 瓶
Detection antibody, biotinylated (100×)	生物素标记检测抗体浓缩液 (100×) **	120 µL/支	1 支
Streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) (100×)	HRP标记链霉亲和素浓缩液 (100×) **	120 µL/支	1 支
Sample Diluent PT 1-ef	样本稀释液 PT 1-ef	30 mL/瓶	1 瓶
Activator reagent I (1M HCl)	活化试剂 I (1M HCl)	4 mL/瓶	1 瓶
Activator reagent II (1.2M NaOH/0.5 M HEPES)	活化试剂 II (1.2M NaOH/0.5 M HEPES)	4 mL/瓶	1 瓶
Detection Diluent	抗体稀释液	30 mL/瓶	1 瓶
Wash Buffer Concentrate (20×)	浓缩洗涤液 (20×)	30 mL/瓶	1 瓶
Tetramethylbenzidine Substrate (TMB)	显色底物 TMB	12 mL/瓶	1 瓶
Stop Solution	终止液	12 mL/瓶	1 瓶
Plate Cover Seals	封板膜		4 张
储存条件： 1：未开启试剂盒可在2-8℃条件下存放6个月或者在-20℃条件下存放1年 2：已开启试剂盒可在2-8℃存放7天 3：每次实验均使用新的标准品,使用后丢弃			

* 使用对应的样本稀释液对标准品进行复溶，复溶过程避免产生气泡

** 开盖前请离心

五：实验注意事项

- 5.1 避免皮肤接触终止液以及TMB 显色液；
- 5.2 在实验过程中，注意穿戴个人防护装备，如实验服，手套，口罩和护目镜；
- 5.3 请勿将不同批次的试剂进行混用，过期产品请勿使用；
- 5.4 在使用自动洗板机时，板孔加入洗涤液之后，设置30秒的浸泡程序，以提高分析的精确度。

六：样本准备

- 6.1 血清：全血标本室温凝固 30 min后1000×g 离心15 min，取上清立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融。
- 6.2 血浆：可用EDTA、肝素或柠檬酸盐作为抗凝剂，标本采集后1000×g 离心15 min，立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融
(注意：标本溶血会影响检测结果，因此溶血标本不宜进行检测)。
- 6.3 细胞上清：收集细胞培养液，500×g 离心5 min取上清，立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融。

七：试剂准备

7.1 洗涤液 (1×)： 如果洗涤液 (20x) 有晶体析出，37°C加热至晶体全部溶解。按1:20稀释倍数进行稀释：如取30 mL 浓缩洗涤液 (20x) ，加入570 mL 超纯水或去离子水，得到1×洗涤液。

7.2 检测抗体 (1×)： 开盖前瞬时离心，按1:100比例进行稀释，稀释前根据预先计算实验所需的总量配制 (100 μL/孔) ,实际配制时应多配制0.1-0.2 mL。如10 μL检测抗体浓缩液 (100x) 加 990μL **抗体稀释液**进行配制，轻轻混匀。

7.3 HRP标记链霉亲和素 (1×)： 开盖前瞬时离心，按1:100比例进行稀释，稀释前根据预先计算实验所需的总量配制 (100 μL/孔) ,实际配制时应多配制0.1-0.2 mL。如10 μL HRP标记的链霉亲和素浓缩液 (100x) 加 990μL **抗体稀释液**进行配制，轻轻混匀。

7.4 待检测样本：

不同的样本使用相应的样本稀释液进行稀释，如果样本检测值超过标曲最高范围，可将样本进行一定的稀释后再进行实验，使样本的检测值处于标曲范围内，不同样本的稀释倍数需自行优化。

稀释比推荐如下：小鼠血清和血浆样本1:120或1:240稀释；细胞上清样本1:4或1:8稀释；样品采集、处理和储存的差异可能导致测值的改变。

样本测定前需要进行活化处理，活化步骤如下：

将样本中惰性 TGF-beta1 转化为免疫活化形式，请按以下步骤将样本活化：

确保活化后样品的pH值pH值在7.2-7.6之内。可根据需要调整中和试剂的体积和相应的稀释系数。

注意：不要活化试剂盒中标准品，标准品里包含活化的重组蛋白TGF-beta1。

细胞上清样本	血清/血浆
20μL 浓度为 活化剂 I (1M HCl)加到100 μL 细胞上清样本.	25μL 浓度为 活化剂 I (1M HCl)加到50 μL 血清或血浆样本
混匀	混匀
室温孵育10 min	室温孵育10 min
20 μL 浓度为活化试剂 II (1.2M NaOH/0.5 M HEPES) 去中和酸性处理样本	25 μL 浓度为活化试剂 II (1.2M NaOH/0.5 M HEPES) 去中和酸性处理样本
混匀	混匀
立即上样测定	用抗原稀释液PT 1-ef去稀释活化后的样本，然后立即上样测定
拟合浓度需要乘上稀释倍数1.4。	拟合浓度还需要乘以活化过程产生的稀释倍数2。

细胞上清样本（人源与非人源）需原液检测，但若内源性水平较高则可能需进行稀释（如原液检测，样本最终稀释系数为1.4）。

小鼠血清/贫血血小板血浆* 样本需使用样本稀释液 PT 1-ef (按1:2稀释)[†] 进行60倍稀释。建议稀释方案为：10 μL活化样本 + 590 μL 样本稀释液 PT 1-ef（按1:2稀释）（样本最终稀释系数为120倍）。

* 根据血小板污染程度的不同，可能需要不同的稀释比例。

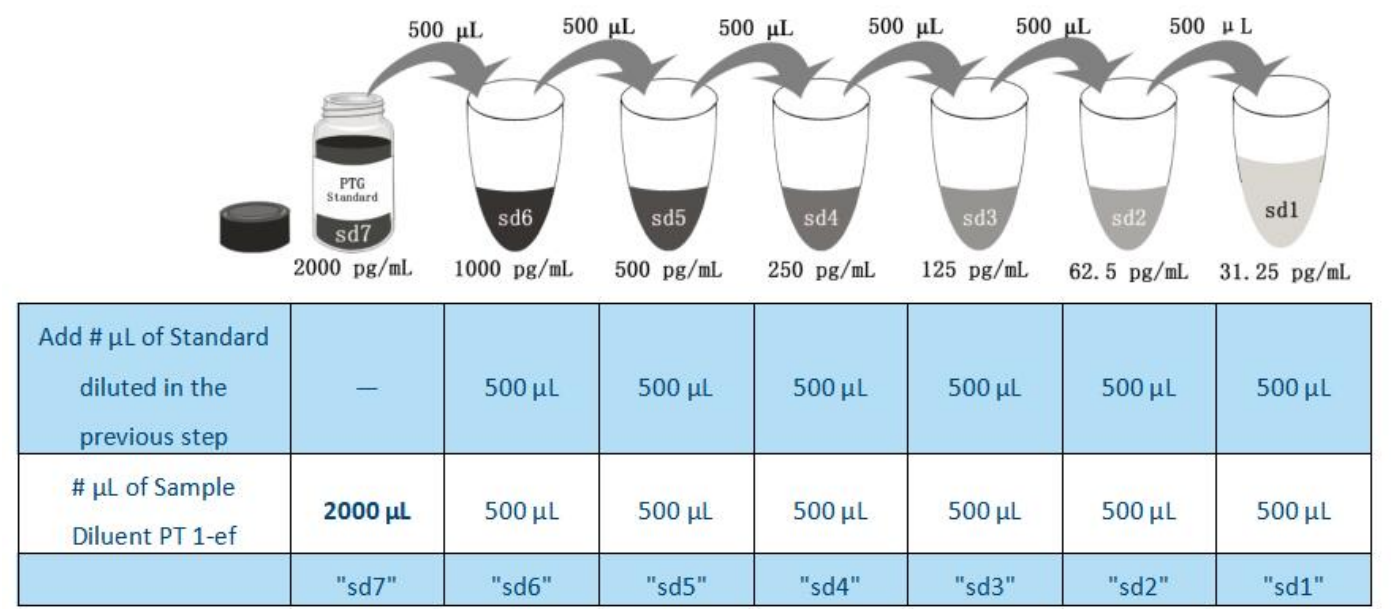
† 具体操作请参见试剂准备章节。

活化的血清和血浆样品在使用前可在 2-8 °C 下保存24个小时。

活化的细胞培养上清液样品必须在活化后立即检测。请勿冷冻活化样本。

注意：此试剂盒与牛、猪、马以及山羊存在交叉反应。因此，培养基不应含有与上述物种相关的血清组分。

使用2mL PT 1-ef样本稀释液复溶标准品，具体操作如下：



八：实验步骤

实验前，需要将所需试剂在室温平衡20-30 min (检测抗体浓缩液、HRP标记链霉亲和素浓缩液不需要平衡室温，即用即取)；在进行标准品、样本以及不同试剂加样时，更换枪头，避免接触微孔板的内表面，不同的试剂，使用不同的加样槽。

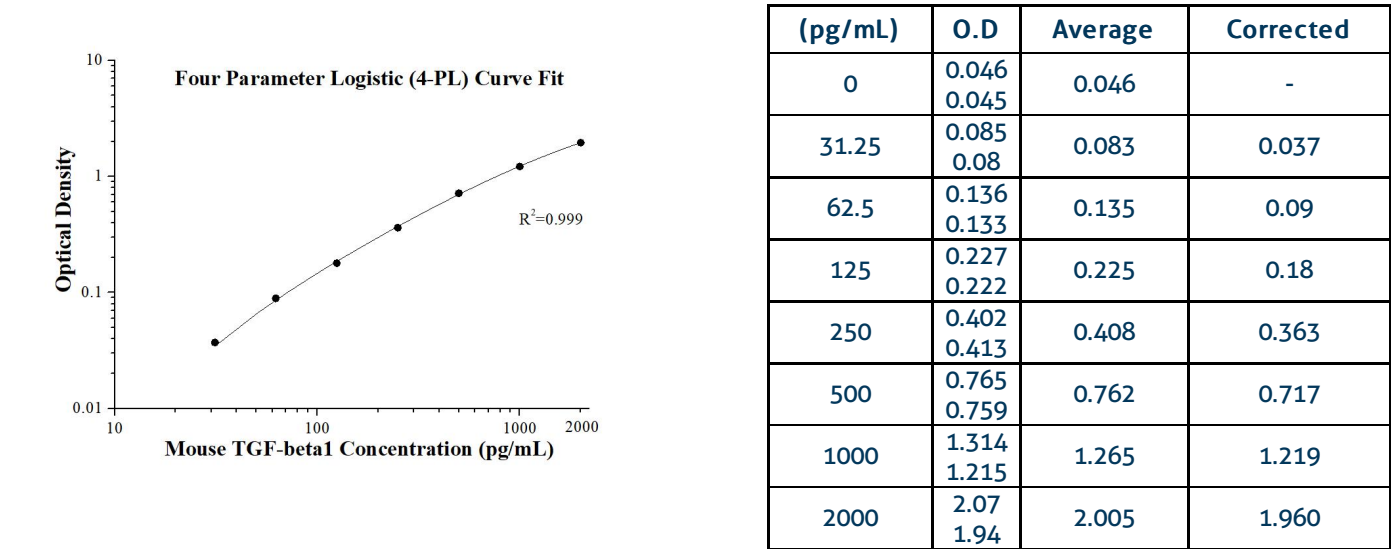
- 8.1 根据实验用量，取出需要用到的酶标板条，剩余板条加入干燥剂放入铝箔袋密封后存放于4℃，并于一周之内用完；
- 8.2 加样，分别设零孔、标准孔、待测样本孔。零孔加样本稀释液100 µL，余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本100 µL/孔，注意不要产生气泡（建议标准品和样本都做复孔，尽量避免实验误差，确保上样不间断，5-10 min完成加样）；
- 8.3 酶标板盖上覆膜，37℃孵育2 h；
- 8.4 洗涤
 - 1) 揭开封板膜（动作轻柔，避免动作过大导致液体溢出串孔），弃液体，拍干；
 - 2) 洗涤液（1x）洗涤板条，每孔350-400 µL，洗涤后，甩掉液体拍干板条，重复此步骤4次，避免异物进入板孔以及板条干燥；
- 8.5 每孔加100 µL 检测抗体（1x）(参照试剂准备部分7.2)，盖上封板膜，37℃孵育1 h；
- 8.6 重复步骤8.4；
- 8.7 每孔加 100 µL HRP标记链霉亲和素（1x）(参照试剂准备部分7.3)，盖上封板膜，37℃孵育40 min；
- 8.8 重复步骤8.4；
- 8.9 显色:每孔加TMB显色液100 µL，37℃避光显色 15-20 min (如果颜色偏浅,可适当延长显色时间,不超过30 min;保持显色底物始终处于避光状态，显色底物在加样前应是无色透明，如有变色，请勿使用)；
- 8.10 终止：每孔加终止液100 µL，蓝色变黄色。终止液与TMB显色液的加样顺序一致；（注意：眼睛和皮肤避免接触终止液）；
- 8.11 读数:以630 nm为校正波长,用酶标仪在450 nm波长测量各孔的光密度(OD值)。加入终止液后5 min内进行读数,若无630 nm 波长，也可直接使用450 nm 波长读数；
- 8.12 数据分析: 每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值,设置复孔,取其平均值。以标准品的浓度为横坐标, OD值为纵坐标,使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

操作流程如下：

步骤	试剂	体积	孵育时间	洗涤次数	孵育温度
1	标准品或样本	100 μL	120 分钟	4 次	覆膜后37℃孵育
2	检测抗体 (1×)	100 μL	60 分钟	4 次	覆膜后37℃孵育
3	HRP标记链霉亲和素 (1×)	100 μL	40 分钟	4 次	覆膜后37℃孵育
4	显色 TMB	100 μL	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37℃孵育，避光
5	终止液	100 μL	0 分钟	不需要洗涤	-
6	加入终止液后以630 nm为校正波长，在450 nm处测量OD值，此过程建议不超过5分钟				

九：实验参数

9.1 参考标曲图



9.2 精密度

板内精密度: 3个不同浓度的样本在板内重复测定 20 次；

板间精密度: 3个不同浓度的样本在板间重复测定 24 次。

板内精密度 (CV内)					板间精密度 (CV 间)				
样本	数量	平均值 (pg/mL)	标准差	变异系数CV%	样本	数量	平均值 (pg/mL)	标准差	变异系数CV%
1	20	72.4	3.3	4.5	1	24	58.9	4.4	7.5
2	20	154.8	11.1	7.2	2	24	128.0	6.8	5.3
3	20	295.8	19.7	6.7	3	24	248.0	17.4	7.0

9.3 加标回收率

样本稀释后，在标曲范围内选择高、中、低3个浓度，进行小鼠TGF-beta1的加标回收率实验，结果如下：

样本类型	稀释比例	均值 (%)	范围 (%)
小鼠血清	1:300	94	88-109
	1:600	101	84-115
细胞上清	1:4	93	80-102
	1:8	89	84-98

9.4 样本值

小鼠血清 - 应用本试剂盒，检测来自小鼠血清中小鼠TGF-beta1的浓度：

样本类型	均值 (ng/mL)	范围(ng/mL)
小鼠血清 (n=10)	66.8	41.2-99.3

细胞上清 - 小鼠EL-4淋巴母细胞 (1×10^6 cells/mL) 在添加10%胎牛血清的DMEM中培养3天，再用10 ug/mL PMA和10 ug/mL PHA刺激。收集细胞上清，检测小鼠TGF- β 1的浓度。

刺激条件	(ng/mL)
未刺激	1.1
刺激	3.9

样本类型	样本1	样本2	样本3	样本4
SP2/0 细胞上清	648 pg/mL	846 pg/mL	1044 pg/mL	1236 pg/mL

9.5 灵敏度

用20个重复的零孔平均OD值加上两倍标准差得到的OD值带入标准曲线拟合出对应的浓度值，此试剂盒中小鼠TGF-beta1的灵敏度为16.0 pg/mL。

9.6 线性

小鼠血清和细胞上清用对应样本稀释液稀释样本，使稀释后的检测值处于标曲范围内，线性数据如下：

(小鼠血清样本预先稀释30倍；细胞上清样本预先稀释2倍)

		小鼠血清	细胞上清
1:2	均值 (%)	86	91
	范围 (%)	83-90	86-97
1:4	均值 (%)	102	101
	范围 (%)	95-108	93-110
1:8	均值 (%)	102	102
	范围 (%)	92-111	86-116
1:16	均值 (%)	112	105
	范围 (%)	102-123	86-116

十：参考文献

1. Siegel, P.M.et al. (2003) Nat Rev Cancer 3: 807-21.
2. Brier, B. et al. (2006) Nat Rev Cancer 6: 506-20.
3. Tian, M. et al. (2009) Future Oncol 5: 259-71.
4. Priyadarshi S. et al.(2013) 28: 2490-7.