

大鼠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: KE20010

规格: 96T

灵敏度: 3.4 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大鼠TGF-beta1浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

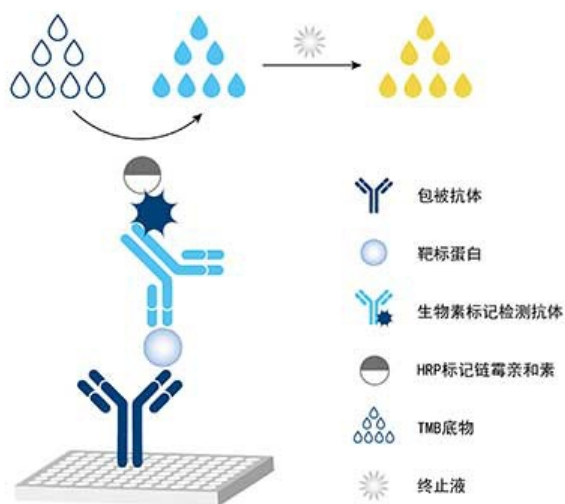
目录

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	8
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。TGF- β 似乎会促进某些癌症的晚期进展和转移。

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	2 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 (20×) 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 (20×), 加入 570 mL 超纯水或去离子水, 得到洗涤液 (1×)。

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 (100×) 加 990 μL **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 (100×) 加 990 μL **抗体稀释液**进行配制, 轻轻混匀。

7.4 待检测样本：

将样本中惰性TGF-β1 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, 标准品包含活化的重组蛋白TGF-β1。

细胞上清样本	血清/血浆
20μL 活化剂 I (1M HCl) 加到100 μL 细胞上清样本.	25 μL 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活化试剂 II (1.2M NaOH/0.5 M HEPES) 去中和酸性处理样本	25 μL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
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	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)。

大鼠血清/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125倍稀释。建议稀释方案为: 5 μL活化样本 + 620 μL 样本稀释液 PT 1-ef (按1:2稀释) (样本最终稀释系数为250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。

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: 活化的大鼠血清和血浆样本1:250或1:500稀释; 活化的细胞上清1:2或1:4稀释; 稀释样品采集、处理和储存的差异可能导致测值的改变。

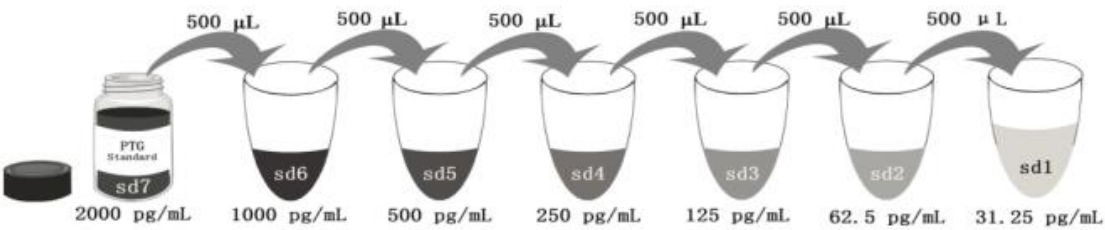
活化的血清和血浆样品在使用前可在 2-8 °C 下保存24个小时。

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。

7.5 梯度稀释的标准品：

使用2 mL PT 1-ef 样本稀释液复溶标准品，具体操作如下：



Add # µL of Standard diluted in the previous step	—	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
# µL of Sample Diluent PT 1-ef	2000 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
	"sd7"	"sd6"	"sd5"	"sd4"	"sd3"	"sd2"	"sd1"

八：实验步骤

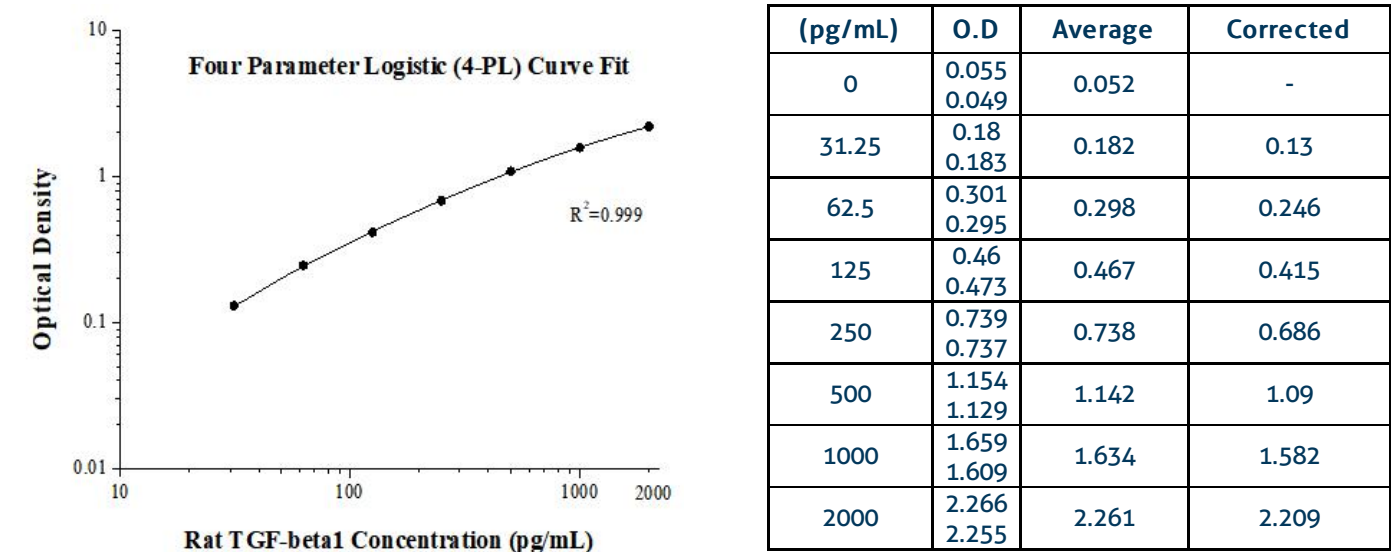
- 实验前，需要将所需试剂在室温平衡20-30 min (检测抗体浓缩液、HRP标记链霉亲和素浓缩液不需要平衡室温，即用即取)；在进行标准品、样本以及不同试剂加样时，更换枪头，避免接触微孔板的内表面，不同的试剂，使用不同的加样槽。
- 8.1 根据实验用量，取出需要用到的酶标板条，剩余板条加入干燥剂放入铝箔袋密封后存放于4℃，并于一周之内用完；
- 8.2 加样，分别设零孔、标准孔、待测样本孔。零孔加样本稀释液100 µL，余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本100 µL/孔，注意不要产生气泡（建议标准品和样本都做复孔，尽量避免实验误差，确保上样不间断，5-10 min完成加样）；
- 8.3 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（1×）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（1×）（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（1×）（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	43.6	3.3	7.5	1	24	55.5	4.5	8.1
2	20	245.3	11.1	4.5	2	24	251.8	23.0	9.1
3	20	1027.5	53.2	5.2	3	24	1079.7	94.4	8.7

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，进行大鼠TGF-beta1的加标回收率实验，结果如下：

样本类型	稀释倍数	均值(%)	范围(%)
大鼠血清	1:1000	101	93-106
	1:2000	97	81-114
细胞上清	1:5.6	98	78-116
	1:11.2	101	81-126

9.4 样本值

应用本试剂盒检测16例大鼠血清中大鼠TGF-beta1的浓度，结果如下：

样本类型	均值 (ng/mL)	范围 (ng/mL)
大鼠血清 (n=16)	74.4	21.1-130

细胞上清-在添加10%胎牛血清、5 μ M β -巯基乙醇、2 mM L-谷氨酰胺、100 U/mL青霉素、100 μ g/mL硫酸链霉素的DMEM培养基中培养大鼠脾细胞3天，取细胞培养上清，检测大鼠TGF-beta1浓度，测值为684.4 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，此试剂盒中大鼠TGF-beta1的灵敏度为3.4 pg/mL。

9.6 线性

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：

(活化大鼠血清样本预先稀释120倍)

稀释倍数		大鼠血清	细胞上清
1:2	均值 (%)	98	100
	范围 (%)	88-107	-
1:4	均值 (%)	100	110
	范围 (%)	-	96-120
1:8	均值 (%)	88	102
	范围 (%)	78-100	96-107
1:16	均值 (%)	89	113
	范围 (%)	78-109	93-121

十：参考文献

1. Siegel, P.M.et al. (2003) Nat Rev Cancer 3: 807-21.
2. Bierie, 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.