

人转化生长因子 β 1 酶联免疫吸附测定试剂盒

产品编号: MA0736 规格: 96 次

产品内容

产品组成	体积/数量
人 TGF- β 1 预包被板	8 孔条 \times 12 个
样品稀释液	30mL
TGF- β 1 活化剂 I	2mL
TGF- β 1 活化剂 II	2mL
重组人 TGF- β 1 标准品(冻干)	2 支(10ng/支)
生物素标记人 TGF- β 1 抗体	130 μ L(效价 1:100)
抗体稀释液	12mL
酶复合物(HRP 标记的链霉亲和素)	130 μ L(效价 1:100)
酶复合物稀释液	12mL
浓缩洗涤液(25 \times)	30mL
显色剂 TMB	10mL
终止液	10mL
封板胶纸	4 张

产品简介

本试剂盒采用双抗体夹心ELISA法,用于检测样品中人TGF- β 1的浓度。人TGF- β 1捕获抗体已经预包被于酶标板上,当加入样品或标准品时,其中的人TGF- β 1会与捕获抗体结合,而其它游离成分则会通过洗涤被除去。接着,再加入生物素标记的人TGF- β 1抗体后,抗人TGF- β 1抗体与人TGF- β 1结合,形成夹心的免疫复合物,其它游离成分则通过洗涤被除去。随后加入酶复合物,生物素与酶复合物特异性结合,这样酶复合物上的HRP就与夹心的免疫复合物连接起来,而其它游离成分则通过洗涤被除去。最后加入显色剂,若样品中存在人TGF- β 1,则会形成免疫复合物,其上连接的HRP会催化无色的显色剂氧化生成蓝色物质,而后加入终止液,最终产物呈黄色。通过酶标仪检测,读取450nm处的OD值,人TGF- β 1浓度与OD450值之间呈正比,通过检测标准品绘制标准曲线,对照未知样品中OD值,即可计算出样品中人TGF- β 1的浓度。

转化生长因子包括TGF- α 和TGF- β 两大类,在免疫调控、炎症和肿瘤发生过程中具有多种生理或病理功能。TGF- β 是已知最强的免疫调控分子之一,是由各种转化细胞及淋巴细胞、单核细胞等正常细胞合成和分泌的,在人体内有三种TGF- β 亚型:TGF- β 1、TGF- β 2和TGF- β 3。人TGF- β 1是一种通过二硫键连接、无糖基化修饰的同源二聚体,分子量为25kDa,其可通过促进合成和抑制降解来提高细胞外基质的沉积,并能够通过多种机制提高免疫抑制。



产品参数:

检测范围	15.62pg/mL~1,000pg/mL
敏感性	10pg/mL
特异性	系统和其它因子无交叉反应
样本类型	人血清、血浆、体液、组织匀浆或细胞培养上清

使用方法

(一) 样品制备

1. 根据样品种类选择相应的处理方法:

(1) 细胞上清: 将细胞培养上清液100~500×g离心5min, 去除悬浮物后即可。

(2) 血清样品: 将全血在室温下静置0.5~2h, 待其自然凝固并析出血清后, 离心取黄色上清即可(4℃, 1,000~2,000×g, 10min), 注意请勿吸取沉淀, 制备好的血清需置于冰上待用, 请勿在其中添加任何防腐剂或抗凝剂;

(3) 血浆样品: 使用EDTA对全血进行抗凝处理后, 混合均匀置于冰上, 离心取黄色上清即可(4℃, 1,000~2,000×g, 10min), 注意请勿吸取沉淀, 制备好的血浆需置于冰上待用;

(4) 组织匀浆/体液: 离心去除沉淀即可。

注意:

①若待测样品无法及时检测, 样品制备完成后, 请分装冻存于-20℃, 避免反复冻融;

②请保证待测样品清澈透明, 检测前如发现样品中有悬浮物, 需通过离心去除;

③为了保证检测结果准确, 请勿使用溶血、黄疸、高血脂或污染的样品。

2. 样品活化与稀释

样品中的TGF-β1大部分以无活性的复合物形式存在, 检测前必须进行活化以释放有活性的TGF-β1蛋白。根据不同样品, 按以下步骤进行操作:

(1) 血清血浆:

①向920 μL样品稀释液中加入20 μL样品, 混匀;

②向上步所得的940 μL预稀释的样品中添加30 μLTGF-β1活化剂I, 混匀, 室温孵育1h;

③孵育完成后, 再添加30 μLTGF-β1活化剂II, 混匀即完成样品活化。

(2) 细胞上清:

①向180 μL样品稀释液中加入20 μL样品, 混匀;

②向上步所得的200 μL预稀释的样品中添加20 μLTGF-β1活化剂I, 混匀, 室温孵育1h;

③孵育完成后, 再添加20 μLTGF-β1活化剂II, 混匀即完成样品活化。

样品类型	样品(μL)	稀释液(μL)	活化剂I(μL)	活化剂II(μL)	稀释倍数
血清血浆	20	920	30	30	1:50
细胞上清	20	180	20	20	1:12

注意: 本试剂盒内的标准品是活化形式的重组TGF-β1, 无需再进行活化。



查阅相关文献，预估样品中待测因子的含量，从而确定适当的稀释倍数，使稀释后样品中待测因子的浓度处于ELISA试剂盒的最佳检测范围，如有需要可将活化后的样品进一步稀释。

如将血清血浆按1:500稀释，可将10 μL上步活化后的血清血浆样品加入90 μL样品稀释液，混匀即可。

如将细胞上清按1:30稀释，可将40 μL上步活化后的细胞上清样品加入60 μL样品稀释液，混匀即可。

(二) 检测准备工作

3.试剂盒自4℃冰箱取出后，请置于室温平衡20min；如从-20℃取出，各组分需彻底融化后再平衡20min；检测完成后，剩余试剂请及时置于4℃或-20℃保存。

4.将浓缩洗涤液(25×)用双蒸水或去离子水稀释成1×洗涤液。

5.重组人TGF-β1标准品的稀释和使用(在使用前2h内准备，室温操作，请严格控制在25~28℃)

(1) 配制10ng/mL标准品：取1mL样品稀释液加入标准品管内，盖好后静置15min以上，然后反复颠倒/搓动以助溶解；

(2) 配制1,000pg/mL标准品：取100μL 10ng/mL的标准品加入有900μL样品稀释液的EP管中，混匀，做上标记；

(3) 按下表将1,000pg/mL标准品用样品稀释液进行倍比梯度稀释。(最高浓度为1,000pg/mL，将标准品稀释液作为浓度0pg/mL。)

管号	稀释液用量(μL)	复溶后标准品用量(μL)	标准品的最终浓度(pg/mL)
A	0	1000	1,000
B	300	300(从A管取出)	500
C	300	300(从B管取出)	250
D	300	300(从C管取出)	125
E	300	300(从D管取出)	62.5
F	300	300(从E管取出)	31.25
G	300	300(从F管取出)	15.62
H	300	0	0

注意：标准品复溶加样后，剩余部分请丢弃。

6.准备生物素标记人TGF-β1抗体工作液

(1) 按每孔需添加100μL抗体工作液，计算其总用量(为弥补操作中的损耗，需多配制100~200μL)；

(2) 按1μL生物素标记人TGF-β1抗体添加99μL抗体稀释液的比例配制工作液，轻轻混匀。

7.准备酶复合物工作液(需在使用前1h内准备)

(1) 按每孔需添加100μL酶复合物工作液，计算其总用量(为弥补操作中的损耗，需多配制100~200μL)；

(2) 按1μL酶复合物添加99μL酶复合物稀释液的比例配制工作液，轻轻混匀。

(三) 检测流程

8.通过计算确定一次实验所需的板条数，取出所需板条放置于框架内，多余的板条请放回铝箔袋密封，保存于4℃或-20℃。



注意：

- ①标准品和样品建议做双复孔检测；
- ②每次实验均需绘制标准曲线。

9.将用样品稀释液稀释后的样品和不同浓度标准品(100 μ L/孔)分别加入相应孔中，用封板胶纸封住反应孔，37 $^{\circ}$ C孵育90min。

注意：

- ①请查阅相关文献确定样品中待检测蛋白的大致浓度，若其大于本试剂盒标准曲线的最大标准品浓度，请将样品适当稀释后再进行检测；
- ②整个加样过程不宜超过10min，否则可能会影响检测结果。

10.甩去酶标板内液体，无需洗板，将板倒扣在吸水纸上拍干。

11.加入稀释后的生物素标记人TGF- β 1抗体工作液(100 μ L/孔)，用封板胶纸封住反应孔，37 $^{\circ}$ C孵育60min。

12.洗板5次，每孔1 \times 洗涤液用量为300 μ L，注入与吸出间隔15~30s，洗完后将板倒扣在吸水纸上拍干。

注意：洗涤过程至关重要，洗涤不充分会导致结果产生较大误差。

13.加入稀释后的酶复合物(100 μ L/孔)，用封板胶纸封住反应孔，37 $^{\circ}$ C避光孵育30min。

14.洗板5次，方法同步骤12；

15.加入显色剂TMB(100 μ L/孔)，用封板胶纸封住反应孔，避光37 $^{\circ}$ C反应10~25min。注意：

- ①在保存和使用时，请勿将TMB接触氧化剂和金属；
- ②因实验室条件差异，最佳显色时间会有所不同，反应充分时肉眼可见标准品的前3~4孔有明显的梯度蓝色。

16.加入终止液(100 μ L/孔)，混匀后即刻使用酶标仪测量OD450，同时设定540nm或570nm作为校正波长，即可计算得到校正吸光度值(OD450-OD540或OD450-OD570)；

注意：读取OD值建议在10min内完成。

(四) 数据分析

17.绘制标准曲线。以标准品浓度作横坐标，OD值作纵坐标，利用计算机软件作四参数逻辑(4-PL)曲线拟合创建标准曲线，通过样品的OD值即可在标准曲线上计算出其相应浓度。

注意：

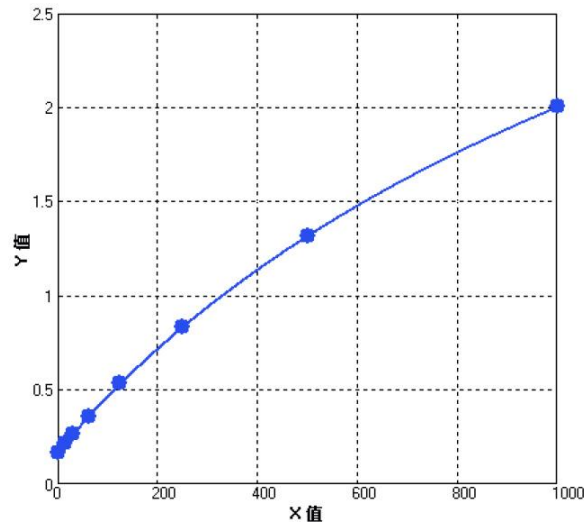
- ①复孔OD值在20%的差异范围内结果才有效，复孔OD值取平均后可作为测量值；
- ②若样品OD值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测，计算浓度时应乘以稀释倍数。



标准曲线范例

人TGF-β1参考标准曲线

标准品浓度	O.D.
0 pg/mL	0.164
15.62 pg/mL	0.218
31.25 pg/mL	0.268
62.5 pg/mL	0.362
125 pg/mL	0.535
250 pg/mL	0.836
500 pg/mL	1.319
1,000 pg/mL	2.003



注意：本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线计算样品含量。

保存条件

2~8℃保存，自生产之日起6个月有效；长期储存请置于-20℃，自生产之日起12个月有效。

注意事项

- 1.浓缩洗涤液低温情况下可能会出现结晶，请水浴加热使结晶完全溶解后再配制工作液；
- 2.严禁混用不同批号试剂盒的组分；
- 3.加样过程请避免产生气泡，实验操作过程中一定要保证试剂充分混匀，否则会使结果产生较大误差；
- 4.说明书中提到的室温条件，请严格控制在25~28℃；
- 5.为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；
- 6.本产品仅限科研使用。

J240101

