

Human/Mouse TGF- β 1 ELISA Kit 检测试剂盒（酶联免疫吸附法）说明书

【货号】EK981

【包装规格】48T、96T

【预期用途】定量检测血清、血浆和细胞培养上清中的人/小鼠转化生长因子 β 1(TGF- β 1)浓度。

【背景介绍】

转化生长因子 β 1(TGF- β 1)是转化生长因子 β 超家族的多肽成员，具有多种细胞学功能，包括调控细胞生长、增殖、分化和凋亡。TGF- β 与TGFA协同诱导转化。它也能作为负向自分泌生长因子。TGF- β 活化和信号传导的失调可能会引起凋亡。很多细胞可合成TGF- β ，且几乎都有特异性的受体。TGF- β 1、TGF- β 2和TGF- β 3都通过相同的受体信号通路发挥功能。TGF- β 1对调控免疫系统具有重要作用，对不同类型的细胞或不同发育阶段的细胞具有不同的活性。大部分免疫细胞(或白细胞)分泌TGF- β 1。TGF- β 1与癌症、自身免疫疾病、肝脏疾病、肾脏疾病、糖尿病、心血管疾病、哮喘、慢性阻塞性肺疾病(COPD)和囊性纤维化(CF)等相关。

【检测原理】

本试剂盒采用双抗体夹心酶联免疫吸附检测技术。特异性捕获抗体预包被在高亲和力的酶标板上。酶标板孔中加入标准品、待测样本和生物素化的检测抗体，经过孵育，样本中存在的待测物质与捕获抗体和检测抗体结合。洗涤去除未结合的物质后，加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(Streptavidin-HRP)。洗涤后，加入显色底物(TMB)，避光显色。颜色反应的深浅与样本中待测物质的浓度成正比。加入终止液终止反应，在450nm波长(参考波长570-630nm)测定吸光度值。

【产品组成】

组分	编号	EK981-48	EK981-96
酶标板	EK981P	48T	96T
标准品	EK981S	1vial	2vials
检测抗体	EK981D	1vial	1vial
标准品稀释液	E0260	5ml	5ml
链霉亲和素	E0290	1vial	1vial
10×检测缓冲液	E0310	10ml	10ml
显色底物	E0230	6ml	11ml
终止液	E0300	11ml	11ml
20×洗液	E0281	50ml	50ml
封板膜	E0200	6	6
HCl	E0302	1vial	1vial
NaOH	E0303	1vial	1vial

注：不同批号试剂盒中的组分不可以互换使用。如上述组分有任何损坏或遗失，请致电400-6721-600与我们的客服部门联系。未经授权或同意，我们不接受无理由的退货。

完成实验需要但未提供的：

- 1) 能够检测450nm吸光度的酶标仪，参考波长570nm或630nm，涡旋振荡器、微孔板振荡器；
- 2) 移液器及枪头、加样槽；试剂用的试管、离心管、量筒等；
- 3) 蒸馏水或去离子水；

【储存条件及有效期】

2~8℃保存，失效日期参见试剂盒标签；

开封后试剂盒：预包被酶标板2~8℃大约可贮存1个月（未使用的板条请放回铝箔袋，封好封口）；标准品-20℃大约可贮存1个月（重溶使用1次后丢弃）；其它组分在2~8℃大约可以贮存1个月。

【样本处理】

1) **细胞培养上清**：离心沉淀之后即刻检测，或者分装，-20℃及以下贮存。

注意：细胞培养基中的动物血清可能含有高浓度的潜隐TGF- β 1。为了获得最好的实验结果，在TGF- β 1测定试验中使用不含动物血清的细胞培

养基。如果使用了含有动物血清的细胞培养基，应该设立适当的对照，确定TGF- β 1的基准浓度。

2) **血清样本**：血清分离管采集血清，室温（25℃±3℃）凝集30分钟。2~8℃放置过夜，以便彻底释放TGF- β 1。1000×g离心10分钟。吸取血清样本之后即刻检测，或者分装，-20℃及以下贮存。

3) **尿液样本**：无菌收集晨尿中段，1000×g离心10分钟除杂。即刻检测，或者分装，-20℃及以下贮存。

注意：未激活的尿液样本在24小时之内，不论是冷藏还是冷冻，表现TGF- β 1浓度降低。样本的贮存条件和贮存期尽量保持一致。

4) **血浆样本**：EDTA作为抗凝剂，采血后30分钟之内，1000×g离心15分钟收集血浆。推荐再增加一次离心，2~8℃，10,000×g离心10分钟，彻底的去除血小板。即刻检测，或者分装，-20℃及以下贮存。

血小板颗粒中TGF- β 1的释放取决于血小板的活化。因此，测定TGF- β 1外周水平，应该收集贫血小板的血浆样本，值得注意的是，临床实验室收集血浆样本的很多操作规范（美国临床实验室标准委员会），都没有彻底的去除血浆样本中的血小板。这就导致因血小板活化释放TGF- β 1，造成实验结果的变异和不可重复。推荐的血浆样本收集步骤，最小化因血小板脱颗粒释放TGF- β 1所带来的影响。然而，即使是最好的操作规范，也不能完全去除某些血小板偶然脱颗粒。

注意：在分析前，冷冻样本应该缓慢的恢复至室温（25℃±3℃），轻柔的混匀。避免样本的反复冻融。本试剂盒可能适用于其它生物学样本。细胞培养上清、血清、尿液和血浆已经过验证。

检测前，样本中可见的沉淀必须去除。不要使用严重溶血或高血脂的样本。样本应分装并贮存于-20℃，以避免待测物质活性的丢失。如果在24小时内检测，样本可以存放在2~8℃。

【样本活化】

按照下面的步骤活化潜隐的TGF- β 1为具有免疫反应性的TGF- β 1。样本中和(pH7.2-7.6)之后，检测分析。使用聚丙烯试管。

注意：不要活化标准品，试剂盒的标准品为活化的TGF- β 1。

活化的血清/血浆样本也许能在2-8℃存放24小时。活化的细胞培养上清/尿液必须在活化后立即检测分析。

1) **细胞培养上清/尿液**：每100 μ l样本加入20 μ l1N HCl，混合均匀，室温（25℃±3℃）孵育10分钟，加入20 μ l1N NaOH进行中和。混合均匀后须立即检测。

注意：由标准曲线读出的浓度值必须乘上稀释因子，最终的稀释因子为1.4。

2) **血清/血浆**：每40 μ l样本加入20 μ l1N HCl，混合均匀，室温（25℃±3℃）孵育10分钟，加入20 μ l1N NaOH进行中和。混合均匀后再使用1×检测缓冲液对血清/血浆样本进行稀释。

人血清：活化样本80 μ l+720 μ l1×检测缓冲液

小鼠血清：活化样本20 μ l+480 μ l1×检测缓冲液

人/小鼠血浆：活化样本80 μ l+80 μ l1×检测缓冲液

注意：由标准曲线读出的浓度值必须乘上稀释因子（人血清：×40；小鼠血清：×100；人/小鼠血浆：×8）。

【检测前准备】

1) **试剂准备**：检测前请将所有的试剂、样本恢复至室温（25℃±3℃），如果浓缩的试剂出现结晶，37℃温浴，直至结晶全部溶解。显色底物在添加之前应是无色的，请保持显色底物始终处于避光态。

“1×洗液”配制：吸取20×洗液50ml至1L的量筒，加蒸馏水至1,000ml，轻轻混匀，避免泡沫。转移至干净瓶内。2-8℃贮存，1×洗液可稳定保存30天。

“1×检测缓冲液”配制：吸取10×检测缓冲液5ml至100ml量筒，加蒸馏水至50ml，轻轻混匀，避免泡沫。2-8℃贮存，1×检测缓冲液可稳定保存30天。

“检测抗体工作液”配制：稀释前充分混匀。根据标准品和待检样本的数量，用1×检测缓冲液按**1: 100**稀释检测抗体。

“链霉亲和素工作液”配制：稀释前充分混匀。根据标准品和待检样本的数量，用1×检测缓冲液按**1: 100**稀释链霉亲和素。

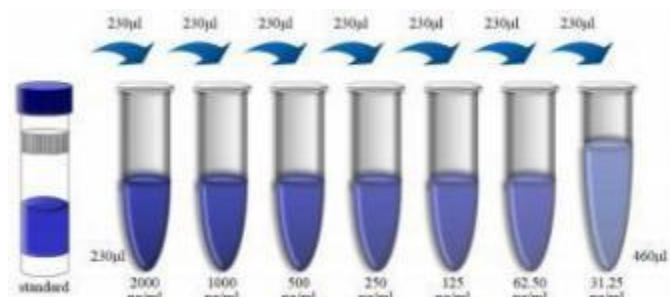
注意：检测抗体工作液、链霉亲和素工作液均应在30分钟内使用。

2) **样本稀释**：为了保证实验成功，由于对样本的处理方式，培养条

件等不同，建议首次使用本试剂盒前先进行一次预实验以摸索最佳的样本浓度，避免因浓度过高使显色反应超出酶标仪的检测上限或稀释倍数过大低于试剂盒灵敏度。对于样本的稀释，请用1×检测缓冲液稀释血清/血浆样本，用细胞培养基稀释细胞培养上清。

3) **标准曲线的制备**：开盖前短暂离心，用蒸馏水在聚丙烯管内重溶标准品，重溶体积标注于标准品的标签上。轻柔地涡旋震荡，确保充分混匀，重溶后标准品的浓度为4,000pg/ml。重溶后静置10-30分钟。稀释前充分混匀。

- 血清/血浆样本标准曲线的制备：取230μl重溶后的标准品，加入230μl标准品稀释液，作为标准曲线的最高浓度(2,000pg/ml)。在每一个试管中加入230μl标准品稀释液。使用高浓度标准品做1：1系列稀释。每次移液时，请确保充分混匀。以标准品稀释液作为标准曲线的零浓度。
- 细胞培养上清样本标准曲线的制备：取230μl重溶后的标准品，加入230μl细胞培养基，作为标准曲线的最高浓度(2,000pg/ml)。在每一个试管中加入230μl细胞培养基。使用高浓度标准品做1：1系列稀释。每次移液时，确保充分混匀。以细胞培养基作为标准曲线的零浓度。



注：如若标准品发生部分潮解，此为保存条件变化所致，并不影响组分的使用。标准品稀释液中可能会观察到蛋白沉淀，该沉淀不影响使用，可以忽略，或者可通过6,000×g离心5分钟去除沉淀。

【检测方法】

- 1) 将不需要的板条拆卸下来，放回装有干燥剂的铝箔袋，重新封好封口。在任何情况下，避免接触微孔板的内表面。
- 2) 每个酶标板上待用的孔加入300μl 1×洗液静置浸泡30秒。弃掉洗液之后，在吸水纸上将微孔板拍干。洗板完成之后，请立即使用微孔板，不要让微孔板干燥。
- 3) 加标准品：标准品孔加入100μl 2倍比稀释的标准品。空白孔加入100μl标准品稀释液(血清/血浆样本)或培养基(细胞培养上清样本)。
- 4) 加样本：**血清/血浆**：样本孔加入50μl 1×检测缓冲液和50μl样本。**细胞培养上清**：样本孔加入100μl细胞培养上清。
- 5) 加检测抗体：每个待测孔加入50μl “检测抗体工作液” (参见试剂准备)。
- 6) 应保证标准品、样本和检测抗体的加样在15分钟内完成，是连续的，不能间断。
- 7) 孵育：使用封板膜封板。100-300转/分钟振荡（保证每孔溶液不撒出且能充分混匀即可），室温（25℃±3℃）孵育1.5小时。**孵育时均应密封好封板膜。**
- 8) 洗涤：弃掉液体，每孔加入300μl洗液洗板，洗涤6次。每次洗板，在吸水纸上拍干。为获得理想的实验性能，必须彻底移除残留液体。
- 9) 加酶孵育：每孔加入100μl “链霉亲和素工作液” (参见试剂准备)。
- 10) 孵育：使用新的封板膜封板。100-300转/分钟振荡（保证每孔溶液不撒出且能充分混匀即可），室温（25℃±3℃）孵育30分钟。
- 11) 重复步骤8）。
- 12) 加底物显色：每孔加入100μl显色底物，避光，室温（25℃±3℃）孵育5-30分钟。
- 13) 加终止液：每孔加入100μl终止液。颜色由蓝色变为黄色。如果颜色呈现绿色或者颜色的变化明显不均匀，说明终止液与显色底物没有充分混匀，请轻轻叩击板框，充分混匀。**终止液的添加顺序应与显色底物的添加顺序相同。**

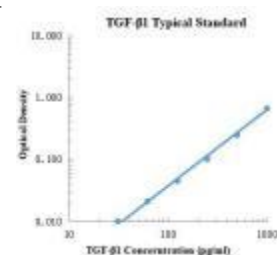
14) 检测读数：在30分钟之内，使用酶标仪进行双波长检测，测定450nm最大吸收波长和570nm或630nm参考波长下的OD值。校准后的OD值为450nm的测定值减去570nm或630nm的测定值。仅使用450nm测定会

导致OD值偏高，并且准确度降低。

【标准曲线示例】

每次检测，每块酶标板都必须设立标准曲线。下面的标准曲线仅作参考。

pg/ml	O.D.	Average	Corrected
0.00	0.025	0.024	0.025
31.25	0.035	0.034	0.035
62.50	0.046	0.045	0.046
125.00	0.068	0.070	0.069
250.00	0.125	0.125	0.125
500.00	0.275	0.267	0.271
1000.00	0.681	0.687	0.684
2000.00	1.675	1.713	1.694



【技术要点】

双抗夹心法ELISA试剂盒如何控制标曲显色？

5-30分钟显色时间为经验范围，每个具体的实验，可根据以下情况，确定大致的显色时间：

- 1) 肉眼观察：标曲S5孔有淡蓝色、Blank孔无明显蓝色时，即可终止；
- 2) 仪器判断：630nm左右波长下，标曲S1孔的OD值达到0.5-0.7、S5孔的OD值达到0.05-0.08、Blank孔的OD值小于0.05时，即可终止；
- 3) 高敏系列试剂盒因灵敏度更高，需严格控制显色时长，可较普通试剂盒适当缩短显色时间。

【局限性】

1) 任何标准品稀释、操作人员、移液技术、洗涤技术、孵育温度、试剂盒保存时间的改变，都将影响结合反应。

本试剂盒在设计上去除或降低了生物学样本中的一些内源性干扰因素，并非所有可能的影响因素都已经去除。

【注意事项】

- 1) 本试剂盒用于科学研究，不能用于诊断治疗。
- 2) 所有的样本和试剂被认为具有潜在危害。实验时佩戴乳胶或一次性手套等防护措施。避免试剂直接接触皮肤和眼睛。如不慎接触，请立即用大量清水清洗。
- 3) 只有经过良好实验室培训的工作人员方可使用本试剂盒，请严格按照本说明书操作。
- 4) 为避免微生物的污染，以及试剂与样本间的交叉污染，请使用一次性枪头，不同的试剂，使用不同的枪头和加样槽；使用干净的容器配制试剂。
- 5) 请不要使用其他批号或其他来源的试剂替代本试剂盒中的试剂；请不要使用过期的试剂；在试剂盒的贮存或孵育过程请避免强光照射。
- 6) 显色底物避免与氧化试剂和金属接触；暴露于酸性环境会抑制结合。
- 7) 避免气溶胶的产生。
- 8) 液体废弃物的处理。不含酸的液体废弃物，加入1.0%的次氯酸钠，浸泡30分钟。含酸的液体废弃物，请先中和，再加入次氯酸钠。
- 9) 在应用自动洗板机时，加入洗液之后，设置30秒的浸泡程序，或者在不同的洗涤步骤将微孔板掉转180度，这样可以提高分析的准确度。
- 10) 推荐所有的检测样本和标准品在检测中设复孔。

【基本信息】

生产厂家：杭州联科生物技术股份有限公司

地址：浙江省杭州市萧山区闻堰街道时代大道4887号湘湖科创园15幢1层、2层

技术服务热线：400-6721-600

网址：www.liankebio.com