

# 小鼠转化生长因子β1 酶联免疫吸附测定试剂盒

## Mouse TGF-β1 ELISA Kit

本产品冰袋运输: 保存于 4℃ (其中 **标准品** 需保存于 -20℃), 保质期 6 个月; **标准品** 如存放于 4℃, 1~2 周内有效。

### 货号规格

HJ205 96次

### 产品特点

- 高灵敏度**——多次重复结果表明, 最小检出量为 1.8 pg/mL;
- 高特异性**——与小鼠 TGF-β2、TGF-β3 等均无交叉反应;
- 重复性好**——板内, 板间变异系数均小于 10%。

### 产品简介

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法检测样品中小鼠转化生长因子β1 (TGF-β1) 的浓度。小鼠 TGF-β1 捕获抗体已经预包被于酶标板上, 当加入样品或标准品时, 其中的小鼠 TGF-β1 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, 再加入生物素化的抗小鼠 TGF-β1 抗体后, 抗小鼠 TGF-β1 抗体与小鼠 TGF-β1 接合, 形成夹心的免疫复合物, 其它游离成分则通过洗涤被除去。随后加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的亲合素, 生物素与亲合素特异性结合, 这样亲合素上标记的 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, 若样品中存在小鼠 TGF-β1, 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, 读其 450nm 处的 OD 值, 小鼠 TGF-β1 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, 即可计算出样品中小鼠 TGF-β1 的浓度。

### 背景简介

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-β1、TGF-β2 和 TGF-β3。人 TGF-β1 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 25 kDa, 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。

### 产品内容

组分	体积或数量
小鼠 TGF-β1 预包被板	12 条
标准品稀释液 (5×)	10 mL
小鼠 TGF-β1 标准品	≥2 支 (冻干)
小鼠 TGF-β1 生物素化抗体	10 mL
HRP 标记的亲合素	10 mL
浓缩洗涤液 (20×)	30 mL
显色剂 TMB	10 mL
终止液	5 mL
HCl (1 N)	3 mL
NaOH (1.2 N)	3 mL
封板胶纸	3 张

## 操作步骤

### ◆ 样品制备

1. 根据样品种类选择相应的处理方法：
  - A. 细胞上清：将细胞培养上清液  $100\sim 500\times g$  离心 5 min，去除悬浮物后即可；
  - B. 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 ( $4^{\circ}\text{C}$ ,  $1,000\sim 2,000\times g$ , 10 min)，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；
  - C. 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 ( $4^{\circ}\text{C}$ ,  $1,000\sim 2,000\times g$ , 10 min)，注意请勿吸取沉淀，制备好的血浆需置于冰上待用；

- 注意：**
- ① 小鼠血清或血浆样品中因 TGF- $\beta$ 1 含量较高，需稀释后再进行检测；
  - ② 若待测样品无法及时检测，样品制备完成后，请分装冻存于  $-20^{\circ}\text{C}$ ，避免反复冻融；
  - ③ 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；
  - ④ 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。

### ◆ 检测准备工作

2. 试剂盒自冰箱取出后，请置于室温平衡 20 min；检测完成后，剩余试剂请及时置于  $4^{\circ}\text{C}$  保存；
3. 将 **浓缩洗涤液 (20 $\times$ )** 用双蒸水或去离子水稀释为 1 $\times$  洗涤液；
4. 将 **标准品稀释液 (5 $\times$ )** 用双蒸水或去离子水稀释为 1 $\times$  标准品稀释液；
5. 按标准品标签上注明的复溶体积，用 1 $\times$  标准品稀释液复溶使标准品终浓度达到 2,000 pg/mL，室温操作，**请严格控制在  $25\sim 28^{\circ}\text{C}$** ，静置 15~20 min 后轻轻混悬，用移液器吹打数次，使其彻底溶解，然后按下表用 1 $\times$  标准品稀释液倍比梯度稀释后依次加入检测孔中。（最高浓度为 2,000 pg/mL，将 1 $\times$  标准品稀释液作为浓度 0 pg/mL。）

管号	稀释液用量 ( $\mu\text{L}$ )	复溶后标准品用量 ( $\mu\text{L}$ )	标准品的最终浓度 (pg/mL)
A	0	250	2,000
B	250	250	1,000
C	250	250 (从 B 管中取)	500
D	250	250 (从 C 管中取)	250
E	250	250 (从 D 管中取)	125
F	250	250 (从 E 管中取)	62.5
G	250	0	0

**注意：**标准品复溶加样后，剩余部分请丢弃。

### ◆ 样品活化与稀释

6. 样品中的 TGF- $\beta$ 1 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- $\beta$ 1 蛋白。本试剂盒提供 1 N HCl 对样品进行活化，以及 1.2 N NaOH 来进行中和，具体步骤如下：
  - A. 细胞上清：取 100  $\mu\text{L}$  样品置于全新的离心管或玻璃管中，加入 20  $\mu\text{L}$  1 N HCl，混匀，室温孵育 10 min 进行活化，接着再加入 20  $\mu\text{L}$  1.2 N NaOH 进行中和，为计算方便，可再加入 60  $\mu\text{L}$  1 $\times$  标准品稀释液使样品稀释至两倍，混匀。注意计算结果时应乘以稀释倍数；
  - B. 血清血浆样品：取 40  $\mu\text{L}$  样品置于全新的离心管或玻璃管中，加入 20  $\mu\text{L}$  1 N HCl，混匀，室温孵育 10 min 进行活化，接着再加入 20  $\mu\text{L}$  1.2 N NaOH 进行中和。对于小鼠的血清、血浆样本，一般需要稀释 18~60 倍，如无明确范围，建议从 20 倍开始稀释，即在中和后的溶液中加入 720  $\mu\text{L}$  1 $\times$  样本稀释液，使样品稀释至 20 倍，混匀。注意结果计算时应乘以稀释倍数。如后续检测时样品中 TGF- $\beta$ 1 浓度过高，超过标准

曲线最高点，请适度加大稀释倍数后重新检测：

**注意：**小鼠 TGF-β1 标准品无需活化。

#### ◆ 检测流程

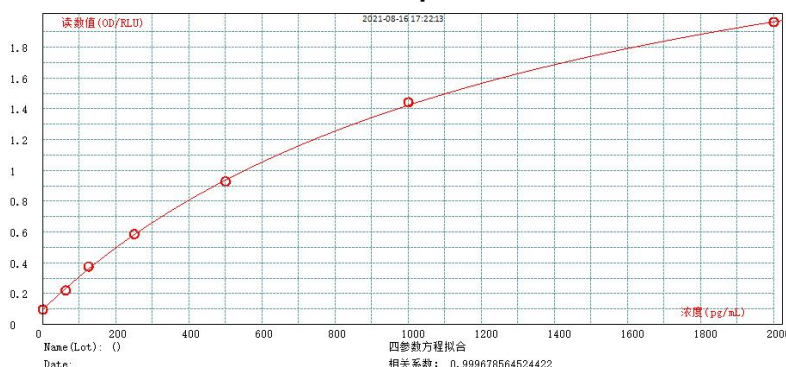
7. 通过计算确定一次实验所需的板条数，取出所需板条放置于框架内，多余的板条请放回铝箔袋密封，保存于 4℃；  
**注意：**① 标准品和样品建议做双复孔检测；  
② 建议设置本底校正孔，即空白孔，只加入相应体积的 **显色剂 TMB** 和 **终止液** 即可；  
③ 每次实验均需绘制标准曲线。
8. 将不同浓度标准品以及活化中和并稀释后的样品 (100 μL/孔) 分别加入相应孔中，用封板胶纸封住反应孔，室温孵育 120 min；  
**注意：**① 请查阅相关文献确定样品中待检测蛋白的大致浓度，若其大于或小于本试剂盒的最高或最低标准品浓度，请将样品适当稀释或浓缩后再进行检测；  
② 整个加样过程不宜超过 10 min，否则可能会影响检测结果。
9. 洗板 5 次，每孔 1× 洗涤液用量为 300 μL，注入与吸出间隔 15~30 s，洗完后将板倒扣在厚吸水纸上拍干；  
**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。
10. 加入 **小鼠 TGF-β1 生物素化抗体** (100 μL/孔，无需稀释)。用封板胶纸封住反应孔，室温孵育 60 min；  
**注意：**检测血清和血浆样品时，检测抗体的孵育时间应适当延长。
11. 洗板 5 次，方法同步骤 9；
12. 加入 **HRP 标记的亲合素** (100 μL/孔，无需稀释)。用封板胶纸封住反应孔，避光室温孵育 20 min；
13. 洗板 5 次，方法同步骤 9；
14. 加入 **显色剂 TMB** (100 μL/孔)，避光室温孵育 10~20 min；  
**注意：**在保存和使用时，请勿将 TMB 接触氧化剂和金属。
15. 加入 **终止液** (50 μL/孔)，混匀后即刻使用酶标仪测量 OD450，同时设定 540 nm 或 570 nm 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 10 min 内完成。

#### ◆ 数据分析

16. 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 每个标准品或样品的 OD 值应减去本底校正孔的 OD 值；  
③ 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

小鼠转化生长因子β1 参考标准曲线



**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。

#### 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。

版本号：21C24