

## 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

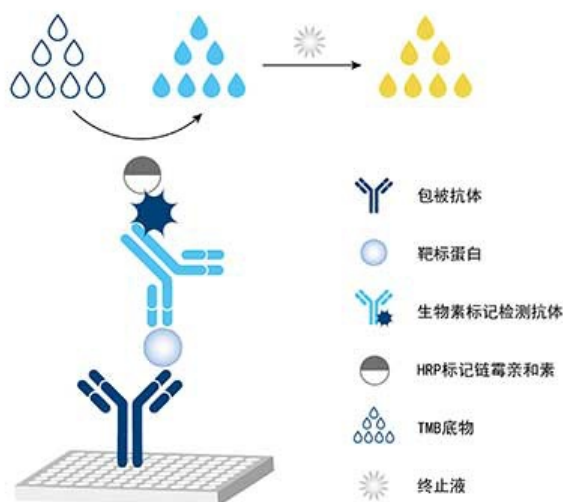
# 目录

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	8
十：参考文献	9

## 一：背景信息

TGF- $\beta$  是细胞因子的转化生长因子  $\beta$  (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- $\beta$  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- $\beta$  与 TGFA 协同作用诱导转化。它还充当负分泌生长因子。TGF- $\beta$  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- $\beta$  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。**

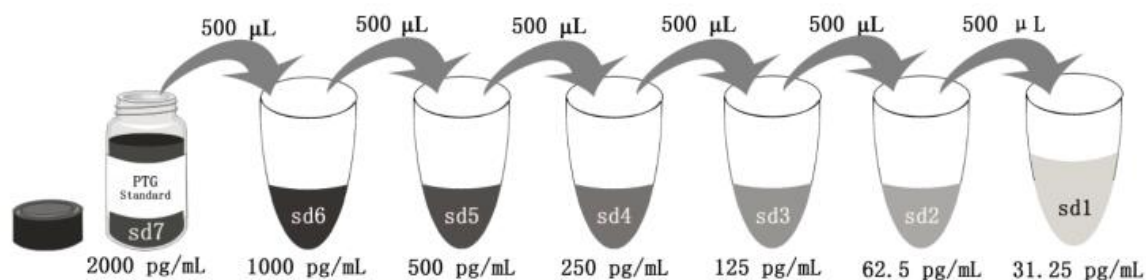
细胞上清样本	血清/血浆
20μL 浓度为活化剂 I (1M HCl)加到100 μL 细胞上清样本.	25μL 浓度为活化剂 I (1M HCl)加到50 μL 血清或血浆样本
混匀	混匀
室温孵育10 min	室温孵育10 min
20 μL 浓度为活化试剂 II (1.2M NaOH/0.5 M HEPES) 去中和酸性处理样本	25 μL 浓度为活化试剂 II (1.2M NaOH/0.5 M HEPES) 去中和酸性处理样本
混匀	混匀
立即上样测定	用抗原稀释液PT 1-ef去稀释活化后的样本，然后立即上样测定
拟合浓度需要乘上稀释倍数1.4。	拟合浓度还需要乘以活化过程产生的稀释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

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：



Add # $\mu\text{L}$ of Standard diluted in the previous step	—	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$
# $\mu\text{L}$ of Sample Diluent PT 1-ef	2000 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$
	"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°C，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  $\mu\text{L}$ ，余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本100  $\mu\text{L}$ /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°C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  $\mu\text{L}$ ，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  $\mu\text{L}$  检测抗体（1x）（参照试剂准备部分7.2），盖上封板膜，37°C孵育1 h；

8.6 重复步骤8.4；

8.7 每孔加 100  $\mu\text{L}$  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°C孵育40 min；

8.8 重复步骤8.4；

8.9 显色：每孔加TMB显色液100  $\mu\text{L}$ ，37°C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  $\mu\text{L}$ ，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；

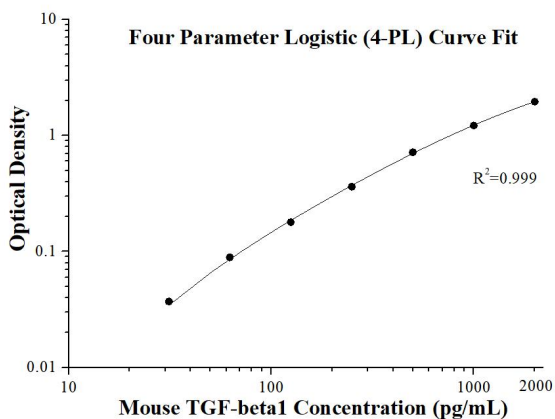
8.12 数据分析：每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD值为纵坐标，使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

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 $\mu$ L	120 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
2	检测抗体 (1 $\times$ )	100 $\mu$ L	60 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
3	HRP标记链霉亲和素 (1 $\times$ )	100 $\mu$ L	40 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
4	显色 TMB	100 $\mu$ L	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37°C孵育，避光
5	终止液	100 $\mu$ L	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



(pg/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.046 0.045	0.046	-
31.25	0.085 0.08	0.083	0.037
62.5	0.136 0.133	0.135	0.09
125	0.227 0.222	0.225	0.18
250	0.402 0.413	0.408	0.363
500	0.765 0.759	0.762	0.717
1000	1.314 1.215	1.265	1.219
2000	2.07 1.94	2.005	1.960

### 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)				
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
2	20	154.8	11.1	7.2
3	20	295.8	19.7	6.7

板间精密度 (CV间)				
样本	数量	平均值 (pg/mL)	标准差	变异系数CV%
1	24	58.9	4.4	7.5
2	24	128.0	6.8	5.3
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 ( $1 \times 10^6$  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-β1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. 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.