

# 大鼠转化生长因子 $\beta$ 1酶联免疫吸附测定试剂盒

Rat TGF- $\beta$ 1 ELISA Kit

本产品需冰袋运输。保存于4°C，保质期6个月；保存于-20°C，保质期12个月。

## 产品参数

货号	HJ147
规格	96次
检测范围	15.62 pg/mL~1,000 pg/mL
敏感性	3.5 pg/mL
特异性	系统和其它因子无交叉反应
样本类型	大鼠血清、血浆、体液、组织匀浆或细胞培养上清

## 产品简介

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法检测样品中大鼠 TGF- $\beta$ 1 的浓度。大鼠 TGF- $\beta$ 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，其中的大鼠 TGF- $\beta$ 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大鼠 TGF- $\beta$ 1 抗体后，抗大鼠 TGF- $\beta$ 1 抗体与大鼠 TGF- $\beta$ 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，若样品中存在大鼠 TGF- $\beta$ 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 450 nm 处的 OD 值，大鼠 TGF- $\beta$ 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，即可计算出样品中大鼠 TGF- $\beta$ 1 的浓度。

## 背景简介

转化生长因子包括 TGF- $\alpha$ 和 TGF- $\beta$ 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- $\beta$ 是已知最强的免疫调控分子之一，在人的体内有三种亚型：TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2 和 TGF- $\beta$ 3，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。人类的 TGF- $\beta$ 1 是一个通过二硫键连接、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，并且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
大鼠TGF-β1预包被板	8孔条×12个
样品稀释液	30 mL
TGF-β1活化剂 I	2 mL
TGF-β1活化剂 II	2 mL
重组大鼠TGF-β1标准品(冻干)	2支(10 ng/支)
生物素标记大鼠TGF-β1抗体	130 μL(效价1:100)
抗体稀释液	12 mL
酶复合物(HRP标记的链霉亲和素)	130 μL(效价1:100)
酶复合物稀释液	12 mL
浓缩洗涤液(25×)	30 mL
显色剂TMB	10 mL
终止液	10 mL
封板胶纸	4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100~500×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0.5~2 h，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，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℃，1,000~2,000×g，10 min)，注意请勿吸取沉淀，制备好的血浆需置于冰上待用；
- D. **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：

- A. **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 μL **TGF-β1 活化剂 I**，混匀，室温孵育 1 h；
  - ③ 孵育完成后，再添加 30 μL **TGF-β1 活化剂 II**，混匀即完成样品活化。
- B. **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 μL **TGF-β1 活化剂 I**，混匀，室温孵育 1 h；
  - ③ 孵育完成后，再添加 20 μL **TGF-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  $\mu$ L 上步活化后的血清血浆样品加入 90  $\mu$ L 样品稀释液,混匀即可。

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

### 检测准备工作

3. 试剂盒自 4°C 冰箱取出后,请置于室温平衡 20 min; 如从 -20°C 取出,各组分需彻底融化后再平衡 20 min; 检测完成后,剩余试剂请及时置于 4°C 或 -20°C 保存;
4. 将 **浓缩洗涤液(25 $\times$ )** 用双蒸水或去离子水稀释成 1 $\times$  洗涤液;
5. 重组大鼠 IL-18 标准品的稀释和使用(在使用前 2 h 内准备, 室温操作, **请严格控制在 25~28°C**)
  - ① 配制 10 ng/mL 标准品: 取 1 mL 样品稀释液加入标准品管内,盖好后静置 15 min 以上,然后反复颠倒 / 搓动以助溶解;
  - ② 配制 1,000 pg/mL 标准品: 取 100  $\mu$ L 10 ng/mL 的标准品加入有 900  $\mu$ L 样品稀释液的 EP 管中,混匀,做上标记;
  - ③ 按下表将 1,000 pg/mL 标准品用样品稀释液进行倍比梯度稀释。(最高浓度为 1,000 pg/mL,将标准品稀释液作为浓度 0 pg/mL。)

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

注意: 标准品复溶加样后, 剩余部分请丢弃。

6. 准备生物素标记大鼠 TGF- $\beta$ 1 抗体工作液
  - ① 按每孔需添加 100  $\mu$ L 抗体工作液,计算其总用量(为弥补操作中的损耗,需多配制 100~200  $\mu$ L);
  - ② 按 1  $\mu$ L **生物素标记大鼠 TGF- $\beta$ 1 抗体** 添加 99  $\mu$ L **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 1 h 内准备)
  - ① 按每孔需添加 100  $\mu$ L 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 100~200  $\mu$ L);
  - ② 按 1  $\mu$ L **酶复合物** 添加 99  $\mu$ L **酶复合物稀释液** 的比例配制工作液,轻轻混匀。

### 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°C 或 -20°C;  
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  $\mu$ L/孔)分别加入相应孔中,用封板胶纸封住反应孔,37°C 孵育 90 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 10 min,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大鼠 TGF- $\beta$ 1 抗体工作液(100  $\mu$ L/孔),用封板胶纸封住反应孔,37°C 孵育 60 min;

12. 洗板 5 次, 每孔 1× 洗涤液用量为 300  $\mu\text{L}$ , 注入与吸出间隔 15~30 s, 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  $\mu\text{L}$ / 孔), 用封板胶纸封住反应孔, 37°C 避光孵育 30 min;

14. 洗板 5 次, 方法同步骤 12;

15. 加入 显色剂 TMB (100  $\mu\text{L}$ / 孔), 用封板胶纸封住反应孔, 避光 37°C 反应 10~25 min;

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  $\mu\text{L}$ / 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

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。

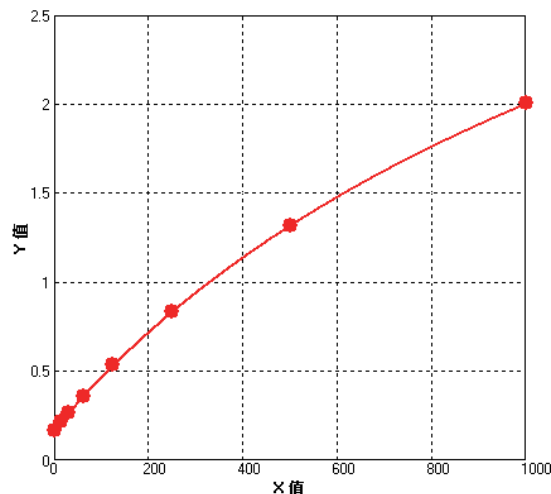
注意: ① 复孔 OD 值在 20% 的差异范围内结果才有效, 复孔 OD 值取平均后可作为测量值;

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

大鼠 TGF- $\beta$ 1 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。

## 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°C;
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。