

ExCell Bio

HUMAN TGF- β 1 ELISA KIT User Manual

Catalog Number EH010-48

EH010-96



产品概述

转化生长因子（TGF）是能够促进培养的成纤维细胞转化为具有肿瘤表型的细胞的一种蛋白因子，后来人们发现与其肿瘤转化作用相比，它更起着肿瘤抑制剂的作用，而且它是 TGF- α 和 TGF- β 两种蛋白质的混合物。这两个蛋白质属于一个超家族成员，包括 TGF- β 1 到 TGF- β 5 骨形成蛋白质、激活素和抑制素。人类的 TGF- β 1 是一个 25KDa 通过二硫键连接在一起的没有糖基化修饰的同源二聚体。在所有哺乳动物中几乎有 100% 的序列保守性。TGF- β 1 生物学活性的发挥需要 TGF- β 1 从潜态复合物中释放出来。在体外下，可以通过分裂 LAP 得以实现（例如酸化作用）。从潜态复合物中释放 TGF 存在三种最基本的活性：TGF- β 1 作为抑制因子调节细胞增殖；TGF- β 1 通过促进合成和抑制降解来提高细胞外基质的沉积；TGF- β 1 通过多种机制起到免疫抑制的作用。TGF- β 对特定细胞的特定作用依赖于细胞所处的环境。

产品原理

本实验采用双抗体夹心 ELISA 法。抗人 TGF- β 1 单抗包被于酶标板上，标本和标准品中的 TGF- β 1 会与单抗结合形成免疫复合物，游离的成分被洗去；加入生物素化的抗人 TGF- β 1 抗体，生物素化抗人 TGF- β 1 抗体与酶标板上结合的标准品或样本中的 TGF- β 1 结合而形成免疫复合物，游离的成分被洗去；加入辣根过氧化物酶标记的亲合素，亲合素与生物素特异性结合，游离的成分被洗去。加入显色底物（显色剂），若反应孔中有 TGF- β 1，辣根过氧化物酶会使无色的显色剂变蓝，加终止液变黄。在 450nm 处测 OD 值，TGF- β 1 浓度与 OD₄₅₀ 值之间呈正相关，可通过绘制标准曲线求出标本中 TGF- β 1 浓度。

产品性能

1. 灵敏度：最小可测人 TGF- β 1 达 15pg/ml 。
2. 重复性：板内、板间变异系数均<10%。

产品应用

本产品适用于体外定量检测人血清、血浆、组织或细胞培养上清液中天然和重组的 TGF- β 1 浓度。


产品规格

货号	品名	规格
EH010-48	HUMAN TGF- β 1 ELISA KIT	48T
EH010-96	HUMAN TGF- β 1 ELISA KIT	96T


产品组分及储存条件

名称	96 Tests	48 Tests	保存条件
1. 抗体包被板条 (Microwell Plate)	8x12	8x6	2-8°C
2. 标准品 (Standard)	2 支 (冻干)	1 支 (冻干)	2-8°C
3. 浓缩生物素化抗体 100x (Biotin-Conjugate)	2 支 (60 μ l/支)	1 支 (60 μ l/支)	2-8°C
4. 浓缩酶结合物 100x (Streptavidin-HRP)	2 支 (60 μ l/支)	1 支 (60 μ l/支)	2-8°C (避光)
5. 试剂稀释液 (Assay Diluent)	2 瓶 (25ml/瓶)	1 瓶 (25ml/瓶)	2-8°C
6. 浓缩洗涤液 20x (Wash Buffer Concentrate)	1 瓶 (30ml/瓶)	1 瓶 (30ml/瓶)	2-8°C
7. 显色剂 (Substrate Solution)	1 瓶 (12ml/瓶)	1 瓶 (6ml/瓶)	2-8°C (避光)
8. 终止液 (Stop Solution)	1 瓶 (12ml/瓶)	1 瓶 (12ml/瓶)	2-8°C
9. 封板胶纸	3 张	2 张	
10. 1N HCL	1支 (1.5ml)	1支 (1.5ml)	
11. 1N NaOH	1支 (1.5ml)	1支 (1.5ml)	
12. 说明书	1 份	1 份	

试验所需自备仪器和试剂:

1. 酶标仪(450nm 检测波长滤光片, 570nm 或 630nm 校正波长滤光片)。
2. 高精度加液器及一次性吸头: 0.5-10 μ l, 2-20 μ l, 20-200 μ l, 200-1000 μ l。
3. 37 $^{\circ}$ C恒温箱、蒸馏水或去离子水、坐标纸。

1 实验流程

一. 标本收集

1. 收集血液的试管应为一次性的无热原, 无内毒素试管。
2. 血浆抗凝剂推荐使用 EDTA。避免使用溶血, 高血脂标本。
3. 标本应清澈透明, 悬浮物应离心去除。
4. 标本收集后若不及时检测, 需按一次使用量分装, 冻存于-20 $^{\circ}$ C, -70 $^{\circ}$ C电冰箱内, 避免反复冻融。
5. 可根据标本的实际情况, 做适当倍数稀释(建议做预实验, 以确定稀释倍数)。

注: 正常人血清或血浆中 TGF- β 1 含量较高, 建议用试剂稀释液做 1:50~1:100 稀释后检测。其他标本需做预实验, 以确定稀释倍数。计算样本含量时应乘以稀释倍数。

血清样本收集:

全血标本室温放置 2 小时或是 4 度过夜后于 2-8 度 1000x g 离心 15min, 取上清即可立即检测。或保存于-20 度/-80 度冰箱。避免反复冻融。

血浆样本收集:

加入抗凝剂后(血浆样本需要抗凝), 标本采集后 30min 内于 2-8 度 1000x g 离心 15min, 取上清即可立即检测, 或保存于-20 度/-80 度冰箱。避免反复冻融。

细胞上清收集:

将细胞培养液于 2-8 度 1000 x g 离心 15 分钟取上清。上清立即用于实验, 或保存于-20 度/-80 度冰箱。避免反复冻融。

组织样本处理:

1. 组织用预冷的生理盐水或 PBS(0.15M、pH7.2)漂洗，去除血液，并用滤纸拭干，剔除附属的结缔组织，称重。
2. 用眼科手术剪尽快剪碎组织块，加 PBS(0.15M、pH7.2)或 0.9%生理盐水，浓度建议 1g (组织湿重) /ml。
3. 匀浆：方式有多种
 - a) 手工匀浆：将剪碎的组织放入预冷的研钵中，充分研碎，使组织匀浆化；为方便研磨，也可将剪成小块的组织直接在液氮中放置后，再放到研钵中研磨。
 - b) 机器匀浆：用组织捣碎机 10000~15000r/min 上下研磨制成组织匀浆，也可用内切式组织匀浆机制备（匀浆时间 10 秒/次，间隙 30 秒，连续 3~5 次），皮肤、肌肉组织等可延长匀浆时间。
 - c) 有些组织：如肝、肾、脑组织液可以用超声粉碎的方法制备组织匀浆。为防止蛋白质降解，以上操作均需要在冰上操作。
4. 将制备好的组织匀浆离心，4°C，10000rpm，离心 10min，弃下面沉淀，留取上清。
5. 将组织匀浆上清分装，冻存，备用。建议放-20°C或者-70°C下保存；使用时充分解冻并混匀。
6. 根据实验需要，取适量上清液进行各种 ELISA 测定。检测样本稀释倍数需要进行摸索，可设置不同倍数进行预实验。稀释液建议使用试剂盒中的样品稀释液。

◆ 检测标本预处理

血清或血浆标本激活方法:

1. 在225ul试剂稀释液中，加入5ul血清或血浆标本。
2. 加10ul 1 N HCl, 盖紧，上下混匀。2—8°C放置60±2分钟。
3. 加10ul 1 N NaOH, 盖紧，上下混匀。(总体积250ul即50倍稀释)
4. 即用，或置-20/-70°C可保存3天。计算结果时应乘以稀释倍数。

细胞培养上清标本激活方法:

1. 在105ul试剂稀释液中，加入125ul标本。
2. 加10ul 1N HCl, 盖紧，上下混匀。2—8°C放置60±2分钟。
3. 加10ul 1N NaOH, 盖紧，上下混匀。(总体积250ul即2倍稀释)。
4. 即用，或置-20/-70°C可保存3天。计算结果时应乘以稀释倍数。

(注意：不同的标本 TGF-β1 的水平可能有较大差异，请根据实际情况灵活掌握稀释度)

二. 检测前准备工作

1. 请提前20分钟从冰箱中取出试剂盒，以平衡至室温。
2. 将浓缩洗涤液用双蒸水稀释（1:20）。未用完的放回4℃。
3. 标准品：加入试剂稀释液至冻干标准品中，使其浓度4000pg/mL，静置15分钟，待其充分溶解后，轻轻混匀。然后根据需要进行稀释。（建议标准曲线使用以下浓度：4000、2000、1000、500、250、125、62.5、0 pg/ml）。

注：复溶标准品原液（4000 pg/ml）若未用完请分装后放入-20℃以下冰箱内保存，保存两个月。已稀释的标准品请废弃。

4. 生物素化抗体工作液：按当次试验所需用量，用试剂稀释液稀释浓缩生物素化抗体(1:100)配置成生物素化抗体工作液。使用前30分钟准备。仅供当日使用。
5. 酶结合物工作液：按当次试验所需要用量，用试剂稀释液稀释浓缩酶结合物(1:100)配置成酶结合物工作液。使用前30分钟准备。仅供当日使用。

三. 洗涤方法

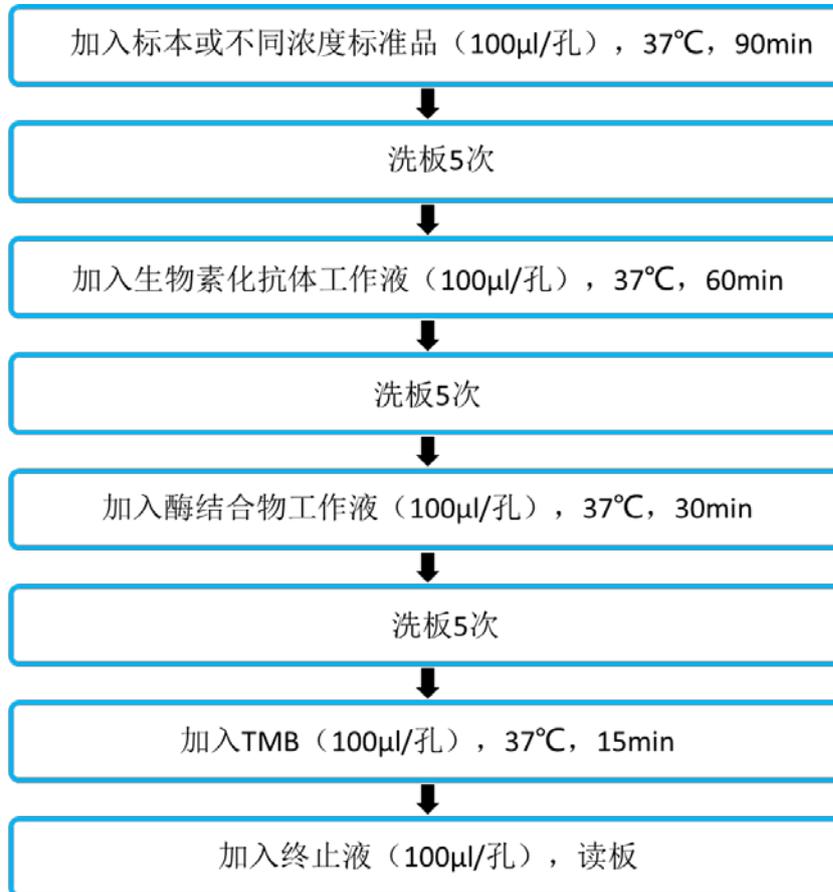
1. 自动洗板机：要求注入的洗涤液为350μl，注入与吸出间隔20—30秒。
2. 手工洗板：每孔加洗涤液350μl，静置30秒后甩尽孔内液体，在厚透吸水纸上拍干。

四. 操作步骤

1. 从已平衡至室温的密封袋中取出试验所需板条，未用的板条和干燥剂请放回铝箔袋内封存于4℃。
2. 预留空白孔（若使用双波长读板，空白孔可以不设）。
3. 分别将标本或不同浓度标准品（0pg/ml孔加试剂稀释液）加入相应孔中(100μl/孔)，用封板胶纸封住反应孔，37℃孵箱孵育90分钟。
4. 提前30分钟制备生物素化抗体工作液。
5. 使用配置好的洗液洗板5次。

6. 除空白孔外，加入生物素化抗体工作液(100 μ l/孔)。用封板胶纸封住反应孔，37 $^{\circ}$ C孵箱孵育60分钟。
7. 提前30分钟制备酶结合物工作液。室温避光放置。
8. 使用配置好的洗液洗板5次。
9. 除空白孔外，加入酶结合物工作液(100 μ l/孔)。用封板胶纸封住反应孔，37 $^{\circ}$ C孵箱，避光孵育30分钟。
10. 使用配置好的洗液洗板5次。
11. 加入显色底物（包括空白孔）100 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C孵箱，避光孵育15分钟。
12. 加入终止液（包括空白孔）100 μ l/孔，混匀后即刻测量OD₄₅₀值(10分钟内)。

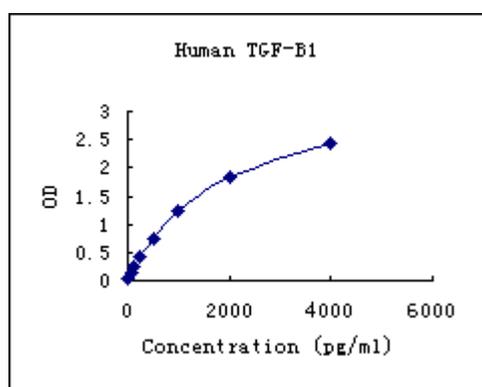
五. 操作流程



结果分析

1. 每个标准品和标本的 OD 值应减去零孔的 OD 值。（若双波长读板，可不需要减去零孔值）。
2. 绘制标准曲线。以标准品浓度作横坐标，OD 值作纵坐标，以平滑线连接各标准品的坐标点。通过样本的 OD 值可在标准曲线上计算出其浓度。
3. 若标本 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。

Standard	OD
4000	2.434
2000	1.847
1000	1.252
500	0.743
250	0.427
125	0.248
62.5	0.158
0	0.051



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标本含量。

备注

1. 试剂盒使用前请保存在 2-8°C。除复溶后的标准品，其他成分不可冻结。
2. 浓缩生物素化抗体，浓缩酶结合物体积小，运输中颠簸和可能的倒置，会使液体沾到管壁或瓶盖。因此使用前请用手甩几下或 1000rpm 离心 1 分钟，以使附着管壁或瓶盖的液体沉积到管底。
3. 从冰箱取出的浓缩洗涤液可能有结晶，属正常现象，微加热至 40°C 使结晶完全溶解后再配制洗涤液。
4. 若需分次使用标准品，在其复溶后应按每次用量分装，将其放在 -20 或 -70°C 贮存，避免反复冻融。
5. 不同批号的试剂盒组份不能混用（洗涤液和反应终止液除外）。
6. 充分轻微混匀对反应结果尤为重要，要保证加入到孔内的液体是均一的液体。
7. 酶免试验中标准品和样本检测时建议作复孔。

常见问题及解答

Q1: 标准品 OD 值低

A: 可能原因:

- 1、溶解标准品以及配置生物素标记抗体、浓缩酶结合物时需要采用试剂盒内的试剂稀释液，若采用双蒸水可导致蛋白失活。
- 2、若标准品是粉末状，需加入稀释液之后防止至少 15min 之后才能使用。
- 3、严格根据说明书中的温度进行实验，实验过程中需要用微量振荡器的步骤必须使用。
- 4、严格按照试剂盒建议的波长的读板。
- 5、洗板时间不宜过长。

Q2: 出现“白板”

A: 可能原因:

- 1、若客户买的试剂盒品种 ≥ 2 时需要确认未使用错板条。我们试剂盒内的酶标板都画有颜色，客户可根据颜色区别不同的品种。
- 2、漏加生物素化的抗体工作液或酶结合物工作液。

Q3: 正常的 TMB 应该是什么颜色?

A: 正常的 TMB 应该是无色，若发现 TMB 变成微蓝色，请弃用。

Q4: 如何决定样本的稀释倍数?

A: 来自于正常个体的血清或血浆建议按照说明书提示稀释，若有非正常个体样本，为了结果的有效性以及降低实验风险程度建议客户做预实验决定样本的稀释倍数。

Q5: 样本 CV 值差异大

A: 可能原因:

- 1、若样本需要稀释检测的比例很大，例如 1:100，建议客户先 1:10 再 1:10 稀释。切勿直接在 1 μ l 的样本加入到 99 μ l 的试剂稀释液中。
- 2、将液体加入到孔中时每次的操作手法要一致。