

本试剂盒仅供研究使用, 不可用于诊断!

Research use only, not for diagnostic use!

小鼠 TGF- β 1 ELISA 检测试剂盒使用手册

TGF- β 1 (Mouse) ELISA Kit User Manual

Catalog No.	RGM822-2
储存/Store at	2~8°C, 避光, 标准品保存于-20°C
灵敏度/Sensitivity	3.8 pg/ml
测定范围/Range	15.6~1000 pg/ml



注意! 使用前请阅读安全数据表 (SDS) 并按照指示, 穿戴实验服、防护眼镜和手套操作!

产品描述

本产品为小鼠TGF- β 1酶联免疫吸附定量检测试剂盒。

TGF- β 介绍

转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 是一种25 kDa、通过二硫键连接而形成同源二聚体蛋白。该蛋白在很多关键的发育、免疫和稳态过程均有参与。该分子作为一种390个氨基酸的前体合成, 其包含23个氨基酸的信号肽、255个氨基酸的前区和112个氨基酸的成熟片段区。该分子的后加工有一套非常复杂的流程, 通常会以一种被隐藏的形式分泌。分子在释放之前, 信号序列被切割, 然后其前区被糖基化。糖基化还会出现甘露糖-6磷酸残基的异常结合。随后是在以皮肤蛋白转化酶的介导下进行切割, 产生一个80 kDa、通过二硫键连接的前区(称为LAP, 用于隐藏相关蛋白)和25 kDa二硫化物键连接的成熟片段(称为TGF- β 1)。这两种独立的二硫键连接多肽以非共价相互作用结合, 使TGF- β 1失去活性。尽管这种80 K/25 K蛋白复合物可以直接分泌, 但效率很低。为了促进分泌和细胞外储存, 另一种被称为LTBP、分子量为200 kDa的蛋白通过共价键连接到两条LAP多肽链之一的N端。促进分泌和随后的细胞外基质储存。分泌后, TGF- β 1通过LTBP与细胞外基质共价连接。这种复合物随后被蛋白酶切割并释放, 暴露出LAP上的甘露糖残基。这导致活性的二聚体TGF- β 1的释放。成熟小鼠与大鼠和棉鼠TGF- β 1具有100%的氨基酸序列一致, 与人、犬和猪具有99%的氨基酸序列一致, 与豚鼠有97%的氨基酸序列一致。成熟小鼠的TGF- β 1与TGF- β 2、 β 3的氨基酸序列同源性分别为72%和78%。据推测, 暴露的LAP甘露糖残基能够与细胞表面IGF-II受体结合, 游离的IGF-II受体竞争性破坏LAP-TGF- β 1复合物。

TGF- β 1的高亲和力受体是一种由跨膜丝氨酸/苏氨酸激酶组成的异质复合物。其涉及两种类型; 一种被称为TGF- β 1 RII的、分子量为80 kDa糖蛋白, 它是一种磷酸化组成型配体结合物; 另一种是分子量为55 kDa, 参与信号转导的非配体结合糖蛋白, 被称为TGF- β R1/ALK-5。研究表明, TGF- β 1首先与TGF- β 1 RII结合, 然后启动TGF- β 1 R1的交叉磷酸化, 最终进行信号转导。还有第三种TGF- β 受体, 被称为TGF- β 1 RIII, 它可以是250 kDa的蛋白聚糖, 被称为 β 聚糖, 也可以是180 kDa糖蛋白, 被称为内皮糖蛋白/CD105。也有人提出, TGF- β 1 RIII捕获TGF- β 并将其“传递”给TGF- β 1 RII。有证据表明, 内皮糖蛋白实际上可能进入受体复合物并调节TGF- β 下游信号传

导, 而不是“传递”配体。最后, 尽管ALK-5传统上被认为是TGF- β 1的唯一I型信号受体, 但ALK-1也可能是一种条件依赖性的I型TGF- β 受体。

TGF- β 1具有广泛的活性。在免疫反应过程中, TGF- β 1通过优先诱导小鼠和人产生IgA来影响抗体的产生。它还通过改变趋化因子受体的表达来调节树突细胞的趋化性。最后, 它可以通过抑制巨噬细胞活性和促炎细胞因子分泌来下调炎症反应。在伤口愈合过程中, TGF- β 1从活化的血小板中释放出来。TGF- β 1的这种局部来源对成纤维细胞具有显著的刺激作用, 在成纤维细胞中诱导基质合成。在单核细胞上, 它诱导促炎介质和生长因子分泌。在角质形成细胞上, 它可以通过下调自身的信号通路来促进角质形成细胞增殖。最后, 在发育过程中, TGF- β 1可能在软骨内骨化中发挥作用, 其缺失会导致卵黄囊血管生成和造血严重缺陷。

试剂盒原理

本试剂盒采用夹心法酶联免疫分析技术。

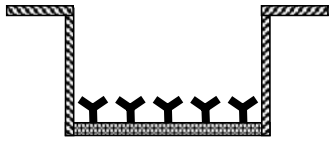


图1. 预包被TGF-β1抗体微孔板

孔板上预包被了抗TGF-β1特异性抗体。

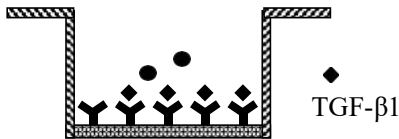


图2. TGF-β1被抗体捕获

样品或标准品中的TGF-β1与包被在微孔中的抗体结合。

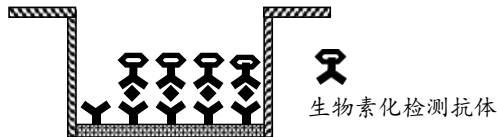


图3. 加入生物素化TGF-β1检测抗体

加入生物素偶联的抗TGF-β1抗体, 该抗体与第一抗体捕获的TGF-β1结合。

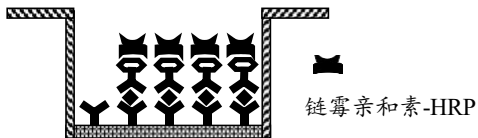


图4. 加入链霉亲和素-HRP

孵育后, 洗去未结合的生物素偶联的抗TGF-β1抗体。加入链霉亲和素-HRP。

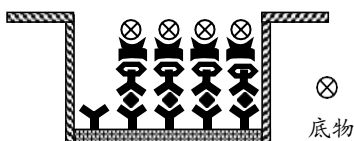


图5. 催化底物形成有颜色产物

加入底物, 经过HRP催化形成有色产物, 产物吸光值与样品或标准品中存在的TGF-β1的量成比例。通过加入酸终止反应, 并在450 nm处测量吸光值。

试剂

小鼠TGF- β 1 ELISA试剂盒 (96次检测)

- 预包被抗TGF- β 1单克隆抗体的微孔板 (12条, 每条8个孔) \times 1块
- 冻干TGF- β 1标准品 \times 2支
- 50 \times 生物素偶联检测抗体 (240 μ l) \times 1管
- 50 \times 链霉亲和素-HRP (240 μ l) \times 1管
- 1 \times 样本稀释液 (24 ml) \times 1瓶
- 1 \times 生物素偶联检测抗体稀释液 (12 ml) \times 1瓶
- 1 \times 链霉亲和素-HRP稀释液 (12 ml) \times 1瓶
- 1 \times TGF样品活化指示液A (5 ml) \times 1瓶
- 1 \times TGF样本活化指示液B (5 ml) \times 1瓶
- 20 \times 清洗缓冲液 (50 ml) \times 1瓶
- 1 \times TMB底物 (12 ml) \times 1瓶
- 1 \times 终止液 (12 ml) \times 1瓶
- 封板膜 \times 6张

试剂盒贮存

- 将试剂盒试剂储存在2至8 $^{\circ}$ C之间, 如长期存放 (>3个月) 需将冻干质控品储存在-20 $^{\circ}$ C以下。
- 使用后, 剩余试剂应立即放回冰箱。
- 请在标签上注明的试剂盒和试剂的有效期内使用。试剂盒只有在正确储存条件下, 才能保证试剂盒成分的有效期。
- 重复使用时避免试剂之间交叉污染。试剂间的污染会造成试剂盒失效。

适用样本与样本处理

- 该试剂盒适用于细胞培养上清、血清、血浆等样本的分析。**样本检测前需提前活化样本, 具体步骤参考说明书P6。**
- 对于血液样本, 应当尽快将血清或血浆分离。样品中出现沉淀时, 需先将沉淀分离后再行分析。避免使用严重溶血或血脂异常的样本。
- 大量的样本应先分装后, 置于-20 $^{\circ}$ C下冷冻保存, 以避免TGF- β 1的活性损失。如果样品在24小时内分析, 可先储存在2~8 $^{\circ}$ C。样品应避免反复冻融。冷冻样品分析前, 应缓慢升至室温, 并轻轻混合。禁止在37 $^{\circ}$ C的水浴中解冻样品。请勿涡旋或剧烈搅动样品。

需准备的材料

- 刻度移液管 (5毫升和10毫升)
- 5 μ L至1000 μ L可调单通道微量移液器
- 50 μ L至300 μ L可调多通道微量移液器
- 一次性吸头
- 一次性样品槽
- 配制试剂所需的烧杯、烧瓶、量筒等

- 自动洗板机
- 多波长酶标仪 (450 nm, 620 nm作为可选参考波长)
- 超纯水
- 带有回归分析程序的统计计算机

注意事项

- 所有化学品都应被视为具有潜在危险。建议仅由接受过实验室技术培训的人员操作使用本产品, 并按遵循良好实验室规范的原则。使用时需穿戴合适的防护服, 佩戴好安全眼镜和手套。应注意避免试剂接触到皮肤或眼睛。如果接触到, 立即用大量水冲洗。具体建议见材料安全数据表 (SDS) 和/或安全声明。
- 试剂仅供研究使用, 不得用于诊断或治疗。
- 请勿将其他批次或其他来源的试剂混合使用或替换。
- 请勿使用标签上过期的试剂盒试剂。
- 在储存或孵育过程中, 请勿将试剂盒试剂暴露在强光下。
- 取用试剂时, 禁止用嘴吸取移液管。
- 请勿在处理试剂盒试剂或样本的区域进食或吸烟。
- 处理试剂盒试剂或样本时, 应佩戴橡胶或一次性乳胶手套。避免皮肤或粘膜接触试剂盒试剂或样本。
- 避免底物溶液与氧化剂和金属接触。
- 避免飞溅或产生气溶胶。
- 为避免微生物、试剂或样本的交叉污染而导致测试无效, 请使用一次性移液器吸头和/或移液器。
- 使用洁净的专用试剂容器分装结合物和底物试剂。暴露在酸中会使结合物失活。
- 试剂稀释和配制需用蒸馏水或纯水。
- 底物溶液使用前必须恢复至室温。
- 被污染的材料或疑似粘有传染性病原体的样本需进行净化处理后再行丢弃。首选方法是121 $^{\circ}$ C下灭菌至少1小时。
- 不含酸的液体废物和中和废物可用1.0%次氯酸钠处理30分钟后排放。酸性液体废物在添加次氯酸钠之前必须先中和。

试剂配制

- 浓缩缓冲液稀释前需恢复至室温。
- 如果浓缩缓冲液中有结晶, 可以预热至结晶溶解后再稀释, 结晶不影响试剂盒性能。

1×清洗缓冲液:

- 将20×浓缩清洗缓冲液(50 mL)全部倒入干净的容器中。用蒸馏水或纯化水定容至1000 mL。也可以根据使用量, 配制所需体积的清洗缓冲液。
- 轻轻搅拌以避免产生泡沫。
- 清洗缓冲液需储存在2~25°C。



清洗缓冲液配制后在3天内使用, 过期可能会影响实验结果!

1×生物素偶联抗TGF-β1检测抗体:

用1×生物素偶联检测抗体稀释液以1:50的比例稀释浓缩的生物素偶联抗TGF-β1检测抗体。



检测抗体稀释后需在30 min内使用, 请勿使用过期产品!

1×链霉亲和素-HRP:

用1×链霉亲和素-HRP稀释液以1:50的比例稀释浓缩的链霉亲和素-HRP。



链霉亲和素-HRP稀释后需在30 min内使用, 请勿使用过期产品!

冻干TGF-β1标准品:

- 按照标签标识的体积使用1×样本稀释液复溶冻干TGF-β1标准品。轻轻摇匀后让复溶的标准品常温静置10-15分钟, 以确保干粉完全溶解(复溶后标准品的浓度为1000 pg/ml)。
- 复溶后的标准品一次性使用, 请勿将剩余的标准品重复使用。
- 复溶后的标准品用1×样本稀释液直接在微孔板或其他干净的样品管中稀释。
- 标准品稀释方法:
 - 1) 取7个干净样品管, 分别标记为: S1、S2、S3、S4、S5、S6、S7。
 - 2) 在样品管S2~S7中分别加入225 μL样本稀释液。

3) 在S1管中加入450 μL复溶标准液(浓度=1000 pg/mL)。

4) 从S1管中取225 μL样品移至S2管中, 混合均匀。

5) 重复上述操作, 连续稀释至S7管。以此创建标准曲线(见图6)。

6) 以1×样本稀释液作为空白对照。

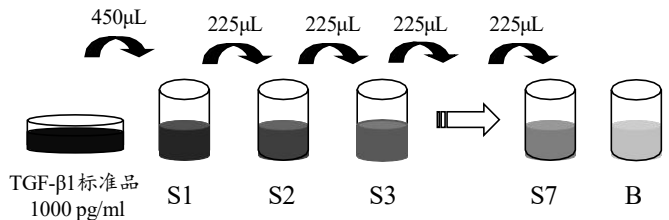


图6. TGF-β1标准品稀释图

试剂盒操作流程

1. 根据待测样品的数量、标准曲线和空白对照等确定测试所需孔条的数量。为确保数据可信度, 每个待测点至少需要两个重复孔。从孔条支架上取下额外的微孔条, 并将其装回铝箔袋中, 重新放置2~8°C下储存。
2. 用大约300 μL 的清洗缓冲液洗涤微孔条每个孔至少2次, 每次洗涤完, 彻底吸出微孔中残留物。保持清洗缓冲液在孔中停留约10~15秒。不要刮伤微孔的表面。完成最后一个清洗步骤后, 吸干孔内残留, 并在吸水垫或纸巾上轻敲微孔条以去除多余的清洗缓冲液。清洗后立即使用微孔板条, 或者将微孔条倒置在湿吸水纸上不超过15分钟, 以免微孔干燥。
3. 按照表1, 依次加入100 μL 不同浓度梯度的标准品。加入100 μL 样本稀释液作为空白对照。

表1. 样品、标准品加样示例

	1	2	3	4
A	标准品A1 1000pg/ml	标准品A2 1000pg/ml	样品A	样品A
B	标准品B1 500pg/ml	标准品B2 500pg/ml	样品B	样品B
C	标准品C1 250pg/ml	标准品C2 250pg/ml	样品C	样品C
D	标准品D1 125pg/ml	标准品D2 125pg/ml	样品D	样品D
E	标准品E1 62.5pg/ml	标准品E2 62.5pg/ml	样品E	样品E
F	标准品F1 31.3pg/ml	标准品F2 31.3pg/ml	样品F	样品F
G	标准品G1 15.6pg/ml	标准品G2 15.6pg/ml	样品G	样品G
H	空白	空白	样品H	样品H

4. 样本活化 (**上样前需提前活化好样本**) :

待测样本中的TGF- β 1在测试前需要经过活化后再分析。由于动物血清中含有大量的TGF- β 1, 因此分析含动物血清的细胞培养上清时, 需要以含动物血清的培养基作为基线分析。

细胞培养上清处理: 取100 μL 待分析样本, 加入20 μL 、1 \times TGF样本活化指示A液(橘色试剂)。室温孵育10分钟, 加入20 μL 、1 \times TGF样本活化指示B液(淡蓝色)。吹打均匀后, 样本变成靛蓝或紫色。

血清或血浆处理: 将待测血清或血浆用PBS按照1:5稀释后, 与细胞培养上清相同的方式活化处理。

(注: TGF样本活化指示A液、B液是专门为TGF系列样本活化开发的试剂, 该试剂能够迅速、直观地指示样本活化和中和的效果。在活化阶段时, 样本为橘色, 变色后样本pH为7.0~7.6。)

避免了传统酸、碱活化时, 导致中和不充分或过度中和的现象, 造成分析偏差)

5. 在待测样品孔中加入50 μL 1 \times 样本稀释液。
6. 将50 μL 活化后的待测样品加到样品孔中, 用封板膜覆盖后, 在室温(18~25°C)下500rpm震荡孵育2小时。
7. 去除液体, 用大约300 μL 的清洗缓冲液洗涤微孔3次。
8. 向所有孔中加入100 μL 、1 \times 生物素化检测抗体。
9. 用封板膜覆盖后, 在室温(18~25°C)下震荡孵育1小时。



孵育过程中未震荡可能造成吸光值偏低。但不影响测定效果!

10. 去除液体, 用大约300 μL 的清洗缓冲液洗涤微孔3次。
11. 向所有孔中添加100 μL 、1 \times 链霉亲和素-HRP。
12. 用封板膜覆盖后, 在室温(18~25°C)下震荡孵育0.5小时。
12. 去除液体, 用大约300 μL 的清洗缓冲液洗涤微孔, 每个孔不少于6次, 每次加入新清洗缓冲液时, 保持浸润15~30秒。
13. 向所有孔中添加100 μL TMB底物溶液。在室温(18~25°C)下避光孵育10~20分钟。当最高浓度标准样品已显深蓝色时, 立即终止显色。也通过测定最高浓度标准样品在620 nm下的吸光值, 当达到0.9~0.95时, 立即终止反应。
14. 向每个孔中迅速加入100 μL 终止液。并尽快读取显色结果。如无法尽快读数, 需将微孔板条避光、2~8°C放置, 且必须在一小时内完成读数。
15. 选择主波长450 nm(任选610~650 nm作为参考波长), 测定每个微孔的吸光值。

数据处理与分析

- 计算每组标准品和样品的平均吸光值, 偏差应 $\leq 20\%$ 。以TGF- $\beta 1$ 浓度为横坐标、标准品的平均吸光值为纵坐标, 绘制标准曲线。建议使用5参数曲线拟合方法绘制最佳拟合曲线。
- 通过样品的平均吸光值, 确定待测样品中TGF- $\beta 1$ 的浓度。
- 按照本实验的稀释方案, 细胞培养上清样品相当于被稀释2.8倍, 血清血浆样本被稀释了14倍。实际浓度应回乘相应的稀释倍数。
- 当计算的浓度超过线性范围内的最大值时, 样本需要进一步稀释, 以便精确定量。
- 典型的标准曲线如图7所示。因操作条件的不同, 每次进行实验时, 应当重新绘制标准曲线。确保结果准确。
- 标准曲线的吸光值可能因分析条件差别而异(例如, 操作员、移液偏差、清洗效果或温度等条件影响)。此外, 试剂盒的保存期可能影响酶活性, 从而影响显色效果。显色效果差异一般不影响实验结果。

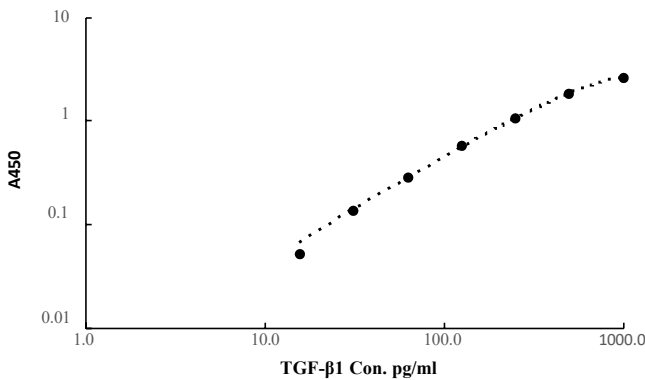


图7. 典型TGF- $\beta 1$ ELISA的标准曲线

表2. 典型TGF- $\beta 1$ ELISA OD450吸光值

测量波长: 450nm

参考波长: 620nm

No.	Con. pg/ml	A450	C.V%
1	1000.0	2.719	1.8
2	500.0	1.919	3.2
3	250.0	1.133	5.2
4	125.0	0.644	3.8
5	62.5	0.354	6.1
6	31.3	0.203	2.3
7	15.6	0.117	6.5
Blank	0.0	0.064	-

限制因素

- 由于样品分析因检测条件而异, 因此每次运行都必须建立新标准曲线。
- 样本或试剂因生物污染或试剂之间的交叉污染可能会导致错误的结果。
- 尽量采用干净一次性移液器吸头、容器等, 对于可重复使用的玻璃器皿, 必须在清洁后使用, 并彻底冲洗掉所有清洁剂。
- 不适当或不充分的清洗将导致假阳性或假阴性结果。
- 在任何新的清洗流程之前需完全吸干残余的溶液, 按照每个步骤要求进行清洗, 不要让孔长时间敞开或干燥。

试剂盒性能

灵敏度

本试剂盒对TGF-β1的灵敏度为**3.8 pg/mL**。

重现性

- 批内分析

通过已知浓度的3个样品, 同一块板上测定20次评估批内差异, 分析结果(见表3)。总批内变异系数为3.7%。

- 批间分析

通过已知浓度的3个样品, 经过2个以上批次的试剂盒, 且经过3个不同实验员的测定20次评估批间差异, 分析结果(见表3)。总批间变异系数为5.4%。

表3. 试剂盒批内与批间分析

样品编号	批内分析			批间分析		
	No.1	No.2	No.3	No.1	No.2	No.3
测定次数	20	20	20	20	20	20
浓度均值 (pg/ml)	960	680	139	724	354	162
C.V(%)	2.1	3.2	5.8	4.1	4.6	7.6

加标回收

通过将4个浓度的TGF-β1掺入正常血清样品来评估回收率。在3个独立的实验中进行测定, 每个实验重复8次。在这些实验中, 以未加标血清用作空白。总平均回收率为90.9%。注意: 回收率差异取决于所用的血清。

稀释平行性

不同浓度TGF-β1的三个血清样品以4个连续梯度的2倍稀释(1:2-1:16), 每个重复4次, 总平均回收率为96.7%。注意: 回收率取决于所用的血清。

特异性

通过将正常生理浓度的干扰因子掺入TGF-β1阳性血清中, 来评估因子的干扰。未检测到交叉反应。