

猪转化生长因子 β (tgf- β) 酶联免疫吸附测定试剂盒

本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断

使 用 说 明 书

- 货号: JL22001
- 规格: 96T/48T
- 种属: 猪
- 检测范围: 1.56-100ng/mL
- 保存温度: 2-8°C
- 有效期: 6个月

tgf-β简介:

转化生长因子β (TGF-β) 是一种多功能的细胞因子, 属于转化生长因子超家族, 包括三种不同的哺乳动物异构体 (TGF-β 1 至 3, HGNC 符号 TGFB1、TGFB2、TGFB3) 和许多其他信号蛋白。TGFB 蛋白由所有白血球系产生。被激活的 TGF-β 与其他因子复合形成丝氨酸/苏氨酸激酶复合物, 与 TGF-β 受体结合。TGF-β 受体由 1 型和 2 型受体亚单位组成。TGF-β 结合后, 2 型受体激酶磷酸化并激活 1 型受体激酶, 从而激活一个信号级联。这导致不同的下游底物和调节蛋白的激活, 诱导不同靶基因的转录, 在分化、趋化、增殖和许多免疫细胞的激活中发挥作用。TGF-β 由包括巨噬细胞在内的许多细胞类型分泌, 呈潜伏状态, 与另外两种多肽--潜伏的 TGF-β 结合蛋白 (LTBP) 和潜伏的相关肽 (LAP) 复合。血清蛋白酶如浆蛋白酶催化活性 TGF-β 从复合物中释放。这通常发生在巨噬细胞的表面, 潜伏的 TGF-β 复合物通过其配体血栓软骨素-1 (TSP-1) 与 CD36 结合。激活巨噬细胞的炎症刺激物通过促进血浆蛋白的激活而增强活性 TGF-β 的释放。巨噬细胞还可以内吞由浆细胞分泌的 IgG 结合的潜伏 TGF-β 复合物, 然后将活性 TGF-β 释放到细胞外液中。其主要功能之一是调节炎症过程, 特别是在肠道。TGF-β 还在干细胞分化以及 T 细胞调节和分化中发挥关键作用。由于其在免疫和干细胞调节和分化中的作用, 它是癌症、自身免疫性疾病和传染病领域中研究较多的一种细胞因子。TGF-β 超家族包括内源性生长抑制蛋白; TGF-β 表达的增加往往与许多癌症的恶性程度和细胞对 TGF-β 的生长抑制反应的缺陷相关。其免疫抑制功能的失调也与自身免疫性疾病的发病机制有关, 尽管其作用是由存在的其他细胞因子的环境介导的。

实验原理:

本试剂盒采用双抗体夹心法酶联免疫吸附试验 (ELISA)。往预先包被有猪转化生长因子β(tgf-β) 捕获抗体的微孔中, 依次加入样本、标准品、生物素标记的检测抗体, HRP 酶结合物, 中间经过温育和洗涤, 用底物 TMB 显色, TMB 在过氧化物酶(HRP)的催化下转化成蓝色, 并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的猪转化生长因子β(tgf-β) 呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度 (OD 值), 计算样品浓度。

灵敏度: 0.71ng/mL

特异性: 可检测样本中猪的 tgf-β, 且与其类似物无明显交叉反应。

注意事项:

1. 严格按照规定的时间和温度进行温育以保证准确结果。所有试剂都必须在使用前达到室温 20-25℃。使用后立即冷藏保存试剂。
2. 洗板不正确可能导致不准确的结果。在加入底物前确保尽量吸干孔内液体。温育过程中不要让微孔干燥掉。
3. 消除板底残留的液体和手指印, 否则影响 OD 值。
4. 底物显色液应呈无色或很浅的颜色, 已经变蓝的底物液不能使用。
5. 避免试剂和标本的交叉污染以免造成错误结果。
6. 在储存和温育时避免强光直接照射。
7. 任何反应试剂不能接触漂白溶剂或漂白溶剂所散发的强烈气体。任何漂白成分都会破坏试剂盒中反应试剂的生物活性。
8. 不能使用过期产品, 不同货号 and 批号组分不得混用。
9. 试剂盒以外来源的重组蛋白可能会出现与本试剂盒抗体不匹配而不被识别的情况。
10. 如果可能传播疾病, 所有的样品都应管理好, 按照规定的程序处理样品和检测装置。

实验所需自备试验器材:

1. 酶标仪 (450nm)
2. 高精度加样器及枪头: 0.5-10uL、5-50uL、20-200uL、200-1000uL
3. 37℃恒温箱
4. 蒸馏水或去离子水

试剂盒组成:

名称	96 孔配置	48 孔配置	备注
预包被 96 孔酶标板 Pre-coated Assay Plate	8 孔×12 条	8 孔×6 条	无
标准品 Standard	2 支	1 支	按说明书进行稀释
通用稀释液 Universal Diluent	2x20mL	1x20mL	无
浓缩生物素化检抗 100× Biotin-antibody (100×)	120μL	60μL	按说明书进行稀释
浓缩酶结合物 100× Streptavidin-HRP (100×)	120μL	60μL	按说明书进行稀释
活化试剂① (1N HCl)	5mL	3mL	无
活化试剂② (1.2N NaOH)	5mL	3mL	无
20×洗涤液 Wash Buffer (20×)	2x10mL	1x10mL	按说明书进行稀释
底物 (TMB) TMB Substrate	10mL	5mL	无
终止液 Stop Solution	6mL	3mL	无
封板膜 Plate Sealer	4 张	4 张	无
说明书 Instruction Manual	1 份	1 份	无

样本处理及要求:

1. **试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围**，建议实验前通过相关文献预估样本中待测物的浓度并通过预实验确定样本的实际浓度情况。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
2. 若所检样本不在说明书所列样本之中，建议做预实验验证其检测有效性。
3. **血清**：将收集于血清分离管的全血标本在室温放置 2 小时或 4℃过夜，然后 1000×g 离心 20 分钟，取上清即可，或将上清置于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。
4. **血浆**：用 EDTA 或肝素作为抗凝剂采集标本，并将标本在采集后的 30 分钟内于 2-8℃1000×g 离心 15 分钟，取上清即可检测，或将上清置于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。
5. **组织匀浆**：用预冷的 PBS (0.01M, pH=7.4)冲洗组织，去除残留血液（匀浆中裂解的红细胞会影响测量结果），称重后将组织剪碎。将剪碎的组织与对应体积的 PBS（一般按 1:9 的重量体积比，比如 1g 的组织样品对应 9mL 的 PBS，具体体积可根据实验需要适当调整，并做好记录。推荐在 PBS 中加入蛋白酶抑制剂）加入玻璃匀浆器中，于冰上充分研磨。为了进一步裂解组织细胞，可以对匀浆液进行超声破碎，或反复冻融。最后将匀浆液于 5000×g 离心 5~10 分钟，取上清检测。
6. **细胞培养物上清**：请 1000×g 离心 20 分钟，取上清即可检测，或将上清置于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。
7. **其它生物标本**：1000×g 离心 20 分钟，取上清即可检测。
8. **样品外观**：样品应清澈透明，悬浮物应离心去除。
9. **样品保存**：样品收集后若在 1 周内进行检测的可保存于 4℃，若不能及时检测，请按一次使用量分装，冻存于-20℃（1 个月内检测），或-80℃（6 个月内检测），避免反复冻融，标本溶血会影响最后检测结果，因此溶血标本不宜进行此项检测。

样本活化:

生物样品中的通常以无活性的形式存在,在检测活化的 $\text{tgf-}\beta$ 前必须进行活化处理。

活化方法如下:

1. **血清、血浆:** 每 20 μL 体积样品中加入 340 μL 通用稀释液, 混匀后加入 10 μL 活化试剂① (1N HCl), 混匀后室温孵育 10 分钟。再加入 10 μL 活化试剂② (1.2N NaOH), 混匀后立即检测。

注意: 样品被稀释了若干倍! 计算样本浓度时需要乘以相应的倍数。

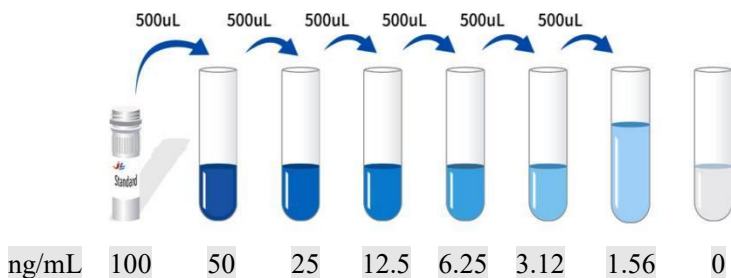
2. **组织匀浆、细胞培养上清:** 每 100 μL 样品中加入 60 μL 通用稀释液, 混匀后加入 5 μL 活化试剂① (1N HCl), 混匀后室温孵育 10 分钟。再加入 5 μL 活化试剂② (1.2N NaOH), 混匀后立即检测。

注意: 样品被稀释了若干倍! 计算样本浓度时需要乘以相应的倍数。

检测前准备工作:

1. 请提前 10 分钟从冰箱中取出试剂盒，平衡至室温。
2. **标准品梯度工作液配制**: 加入 1mL 通用稀释液至冻干标准品中，静置 15 分钟待其完全溶解后轻轻混匀(浓度为 100ng/mL)，然后按照以下浓度: 100ng/mL、50ng/mL、25ng/mL、12.5ng/mL、6.25ng/mL、3.12ng/mL、1.56ng/mL、0ng/mL 进行稀释。

倍比稀释方法: 取 7 支 EP 管, 每管中加入 500 μ L 通用稀释液, 100ng/mL 的标准品工作液中吸取 500 μ L 到第一支 EP 管中混匀配成 50ng/mL 的标准品工作液, 按此步骤往后依次吸取混匀。最后一管直接作为空白孔, 不需要再从倒数第二管中吸取液体, 具体如下图。



3. **生物素化检抗工作液配制**: 使用前 15 分钟将浓缩生物素化抗体于 1000 \times g 离心 1 分钟, 以通用稀释液将 100 \times 浓缩生物素化抗体稀释成 1 \times 工作浓度(例: 10 μ L 浓缩液+990 μ L 通用稀释液), 当日使用。
4. **酶结合物工作液配制**: 使用前 15 分钟将 100x 浓缩酶结合物于 1000 \times g 离心 1 分钟, 以通用稀释液将 100 \times 浓缩 HRP 酶结合物稀释成 1 \times 工作浓度(例: 10 μ L 浓缩液+990 μ L 通用稀释液), 当日使用。
5. **1 \times 洗涤液配制**: 取 10ml 20 \times 洗涤液到 190ml 蒸馏水中 (从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶, 属于正常现象, 可放置室温, 轻摇均匀, 待结晶完全溶解后再配置)。

操作步骤:

1. 从室温平衡 10 分钟后的铝箔袋中取出所需板条，剩余板条用自封袋密封放回 4℃。



2. 加样：分别将样品或不同浓度标准品按照 100 μ l 每孔加入相应孔中，空白孔加入 100 μ L 通用稀释液。盖上封板膜后 37℃温育 1 小时。**(建议：将待测样本用通用稀释液最低稀释 1 倍后再加入酶标板内测试。从而减少基质效应对测试结果的误差影响，最后计算样本浓度时需乘以对应的稀释倍数。所有的待测样本和标准品在检测中建议设立复孔)。**



3. 加生物素化抗体：取出酶标板，弃去液体，不用洗涤。每孔直接加入生物素化抗体工作液 100 μ L，盖上封板膜后 37℃温育 1 小时。



4. 洗板：弃去液体，每孔加入 300 μ L 1x 洗涤液，静置 1 分钟，甩去洗涤液，吸水纸上拍干，如此重复洗板 3 次（也可用洗板机洗板）。



5. 加酶结合物工作液：每孔加入酶结合物工作液 100 μ L，盖上封板膜后 37℃温育 30 分钟。



6. 洗板：弃去液体按步骤 4 洗涤方法，洗板 5 次。



7. 加底物：每孔加入底物(TMB)90 μ L，盖上封板膜，37℃避光温育 15 分钟。



8. 加终止液：取出酶标板，每孔直接加入终止液 50 μ L，立即在 450nm 波长处测定各孔的 OD 值。

实验结果计算:

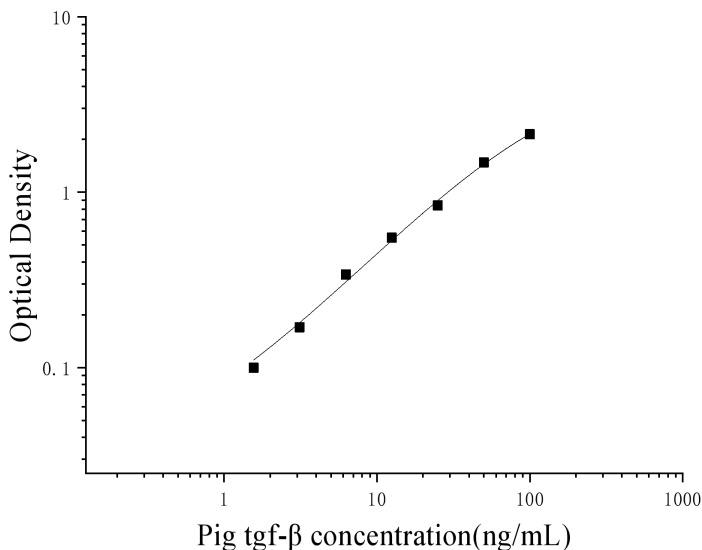
结果判断:

1. 计算标准品和样本复孔的平均 OD 值并减去空白孔的 OD 值作为校正值。以浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，在双对数坐标纸上绘出四参数逻辑函数的标准曲线(作图时去掉空白组的值)。
2. 若样品 OD 值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测并在计算样本浓度时乘以相应的稀释倍数。

典型数据和参考曲线:

以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线。

浓度 (ng/mL)	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0
OD 值	2.22	1.56	0.92	0.63	0.42	0.25	0.18	0.08
校正 OD 值	2.14	1.48	0.84	0.55	0.34	0.17	0.1	-



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。

试剂盒性能:

1. 重复性: 板内变异系数小于 10%, 板间变异系数小于 10%。
2. 回收率: 在选取的健康猪血清、血浆和细胞培养上清中加入 3 个不同浓度水平的猪 $\text{tgf-}\beta$, 计算回收率

样本类型	范围	平均回收率
血清 (n=8)	84-101	96
血浆(n=8)	92-105	102
细胞培养上清(n=8)	96-108	105

3. 线性稀释: 分别在选取的 4 份健康猪血清、血浆和细胞培养上清中加入高浓度猪 $\text{tgf-}\beta$, 在标准曲线动力学范围内进行稀释, 评估线性。

稀释比例	回收率 (%)	血清	血浆	细胞培养上清
1: 2	范围 (%)	84-95	88-96	90-110
	平均回收率 (%)	91	93	95
1: 4	范围 (%)	89-103	87-108	105-115
	平均回收率 (%)	94	98	108

参考文献:

1. Meng, Xiao-ming; Nikolic-Paterson, David J.; Lan, Hui Yao (June 2016).Nature Reviews Nephrology. 12 (6): 325–338.
2. Massagué J (October 2012). Molecular Cell Biology. 13 (10): 616–30.
3. Massagué J, Xi Q (July 2012).FEBS Letters. 586 (14): 1953–8.
4. Li MO, Flavell RA (August 2008).Cell. 134 (3): 392–404.
5. Massagué J, Blain SW, Lo RS (October 2000). Cell. 103 (2): 295–309.



咨询电话： 400-0066-400

传 真： 021-55660885

电子邮箱： shjls@163.com

网 址： www.jonln.com