碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
订货热线: 400-1683301或800-8283301
订货e-mail: order@beyotime.com
技术咨询: info@beyotime.com
网址: http://www.beyotime.com

碧云天网站 微信公众号

Mouse/Rat TGF-β1 ELISA Kit

产品编号	产品名称	包装
PT878	Mouse/Rat TGF-β1 ELISA Kit	96次

产品简介：

- 碧云天的Mouse/Rat TGF-β1 ELISA Kit (Mouse/Rat Transforming Growth Factor-β1 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay Kit)，即小鼠/大鼠转化生长因子β1酶联免疫吸附检测试剂盒，是一种用于特异性地高灵敏地定量检测小鼠或大鼠血清、血浆或细胞培养上清液中的TGF-β1的ELISA试剂盒。
- 本产品检测灵敏度高，特异性强，重复性好。多次重复检测结果表明，最小检出量为24.5pg/ml，与小鼠TGF-β2、TGF-β3和大鼠TGF-β2、TGF-β3等均没有交叉反应，板内、板间变异系数均小于10%。由于成熟的大鼠TGF-β1与小鼠TGF-β1具有100%的氨基酸同源性，因此两种蛋白均能用本试剂盒进行检测。
- 转化生长因子(Transforming Growth Factor, TGF)是一种多效性细胞因子，主要有TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3三种类型，其具有调节细胞外基质产生、伤口愈合、免疫应答、细胞增殖和分化多种功能。TGF-β家族还包括骨形成蛋白(Bone Morphogenetic Protein, BMP)、生长分化因子(Growth Differentiation Factors, GDFs)和神经元营养因子等其他蛋白因子，该家族成员在结构上均能够形成多个链内二硫键。
- 小鼠及大鼠TGF-β1的cDNA编码产生长度为390个氨基酸的前体肽，其中包括29个氨基酸的信号肽和361个氨基酸的前体蛋白。在弗林蛋白酶的作用下，前体蛋白形成249个氨基酸的相关肽(Latency-associated Peptide, LAP)和112个氨基酸的成熟TGF-β1，二者都以同源二聚体的形式存在。经过酶切作用并被分泌出来后，这两个二聚体通过非共价键连接形成了小的无活性复合物。在多种细胞中，小的无活性复合物通过LAP与前体TGF-β结合蛋白(Latent TGF-β Binding Protein, LTBP)结合，形成大的无活性复合物，但这两种复合物都无法与TGF-β受体结合，发挥生物学活性，复合物的激活对TGF-β在体内发挥作用十分重要。成熟的大鼠TGF-β1与小鼠TGF-β1具有100%的氨基酸同源性，与猪、人及犬TGF-β1也具有99%的氨基酸同源性。
- TGF-β1的高亲和受体是由TGF-β RI和TGF-β RII组成的受体复合物，TGF-β RI和TGF-β RII都属于丝氨酸/苏氨酸激酶受体家族。TGF-β RII与TGF-β结合后，就能够激活并磷酸化TGF-β RI。活化的TGF-β RI又能激活Smad蛋白，从而调控转录过程。TGF-β RI又称为活化素受体样激酶(Activin Recptor-like Kinase, ALK-5)，几乎表达于所有细胞表面，其他两种I型受体，ALK-1和ALK-2也能够与TGF-βRII搭档组成TGF-β信号传递受体复合物参与TGF-β信号传递。除了TGF-β RI和TGF-β RII，还有第三种TGF-β1受体，TGF-βRIII (β蛋白聚糖或内皮糖蛋白)同样能够调控TGF-β功能。TGF-β首先与TβRII结合，然后募集并磷酸化TβRI，活化的受体随后磷酸化受体激活型Smads蛋白(R-Smads)，磷酸化后的R-Smads再与辅助型Smads (Co-Smads)结合，形成异源寡聚体复合物，随后进入细胞核内，调节目标基因。
- 本试剂盒采用双抗体夹心ELISA法(Sandwich ELISA)检测样品中小鼠/大鼠TGF-β1的浓度，其原理见图1。小鼠/大鼠TGF-β1特异的单克隆捕获抗体已预包被于酶标板上，当加入标准品或样品时，其中的小鼠/大鼠TGF-β1会与捕获抗体结合。当加入生物素化的抗小鼠/大鼠TGF-β1抗体后，生物素化抗小鼠/大鼠TGF-β1抗体与小鼠/大鼠TGF-β1结合，形成夹心的免疫复合物。随后加入辣根过氧化物酶标记Streptavidin(HRP-Streptavidin)，由于生物素与链霉亲和素(Streptavidin)可以特异性地结合，因此链霉亲和素连接的HRP就会与夹心的免疫复合物连接起来而被固相捕获。最后加入显色剂TMB溶液，固相捕获的辣根过氧化物酶就会催化无色的显色剂氧化成蓝色物质，在加入终止液后呈黄色。通过酶标仪检测450nm处的吸光度值就能实现定量检测。小鼠/大鼠TGF-β1浓度与A450值呈正比，通过绘制标准曲线，对照样品吸光度值，即可计算出样品中小鼠/大鼠TGF-β1浓度。

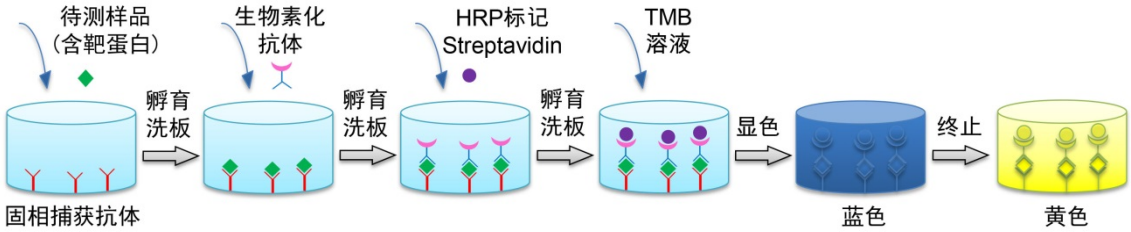

图1. 双抗体夹心ELISA原理图。

- 一个包装的本试剂盒，包括标准品检测，可以进行96次检测 。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
PT878-1	小鼠/大鼠TGF-β1抗体预包被板	8孔×12条
PT878-2	标准品稀释液(5X)	10ml

PT878-3	小鼠/大鼠TGF-β1标准品	2-4瓶
PT878-4	小鼠/大鼠TGF-β1生物素化抗体	10ml
PT878-5	辣根过氧化物酶标记Streptavidin	10ml
PT878-6	洗涤液(20X)	30ml
PT878-7	TMB溶液	10ml
PT878-8	1N HCl	3ml
PT878-9	1.2N NaOH	3ml
PT878-10	终止液	5ml
PT878-11	封板膜(透明)	2张
PT878-12	封板膜(白色)	2张
—	说明书	1份

保存条件：

标准品4°C保存，1-2周内有效，-20°C保存6个月内有效；试剂盒其它组分4°C保存6个月内有效。除标准品外，试剂盒其他组分严禁冻存。

注意事项：

- 由于标准品一般是冻干粉，在制备后需要严格校准，所以标准品的瓶数及每瓶标准品所需加入的稀释液体积请以实际收到的试剂盒及标准品标签上的标注为准。
- 洗涤液(20X)在低温下可能有结晶，如果发现有结晶，请室温水浴加热使结晶完全溶解后再配制工作液。
- 为保证标准品的精确性，标准品配制使用后，如果有剩余请勿再次使用。
- TMB溶液请勿接触氧化剂和金属，否则容易失效。
- 加样时，请注意每个样品或标准品必须更换枪头，一方面避免交叉污染，另一方面也避免吸取体积的误差。
- 同种试剂盒不同批号的试剂盒组分不能混用，每批次试剂盒均经过独立测试。不同试剂盒相同名称的组分严禁混用，多个试剂盒同时检测时，注意避免混淆相同名称不同试剂盒的组分。
- 充分混匀对保证反应结果的精准性很重要，在加液后请轻轻晃动整个96孔板，以保证混匀。
- 本试剂盒很多操作在室温进行，要求严格控制室温在25-28°C。温度低于25°C会导致最终检测到的吸光度显著下降。
- 洗涤过程非常重要，洗涤不充分会使精确度下降并导致结果误差较大。
- 检测标准品和样品时建议设置重复孔，以确保检测结果的可信度。
- 加样过程中须避免气泡的产生。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1．样品准备

a．样品的准备请按下列流程进行操作：

(a) 细胞上清样品离心取上清即可(如100-500g，5分钟)。

(b) 对于血清样品，将全血在室温下放置30分钟至2小时，不要剧烈摇晃以免溶血，待全血自然凝固并析出血清后，4°C约1000-2000g离心10分钟，取黄色上清即得血清，注意不要吸取白色或淡黄色沉淀。制备好的血清需置于冰上待用。

(c) 对于血浆样品，采集的全血建议使用EDTA进行抗凝处理，混匀后置冰上，4°C约1000-2000g离心10分钟，取黄色或淡黄色上清即得血浆，注意不要吸取白色沉淀。制备好的血浆需置于冰上待用。

(d) 若待测样品不能及时检测，样品制备后请分装，冻存于-20°C或-80°C，并注意避免反复冻融。

b．血清样品不应添加任何防腐剂或抗凝剂。

c．样品应清澈透明，检测前样品中如有悬浮物应通过离心去除。

d．请勿使用溶血、高血脂或污染的样品检测，否则结果将不准确。

注：血清或血浆样品可能需要用1X标准品稀释液倍比稀释后再检测。

2．检测前准备工作

a．试剂盒从冰箱中取出后应置室温(25-28°C)平衡20分钟；每次检测后剩余试剂请及时置于4°C保存。

b．配制适当量的洗涤液：将洗涤液(20X)用双蒸水或去离子水稀释至1X，例如10ml洗涤液(20X)加190ml水混匀后即为1X的洗涤液。

c．如有5X标准品稀释液，请按所需用量将稀释液(5X)用双蒸水或去离子水稀释至1X，例如10ml稀释液(5X)加40ml水混匀后即为1X的稀释液。

d．按标准品标签上标注的体积加入标准品稀释液至1瓶标准品中，室温孵育15分钟(为确保标准曲线的准确性，切勿缩短孵育时间)。随后轻轻混匀并用移液枪吹打几次使标准品彻底溶解，使标准品终浓度达到2000pg/ml。通常每个浓度的标准品需要检测2个孔，每个孔的标准品用量为100μl，共需200μl，同时稀释时还需要使用250μl，因此如果1瓶标准品配制后的体积不足0.45ml，请使用更多瓶数的标准品，并在合并混匀后使用。

e．取5个洁净的1.5毫升离心管，每管预先加入250μl的标准品稀释液，并参考图2进行标准品的倍比稀释，最终得到2000、

1000、500、250、125、62.5pg/ml共六个标准品浓度，最后将稀释好的标准品依次加入预包被板孔中，标准品稀释液直接加入作为0pg/ml浓度，共七个标准品浓度。

f. 样品活化和稀释：生物样品中的TGF-β1大部分以无活性的复合物形式存在，检测前必须活化从而得到有活性的TGF-β1蛋白。本试剂盒提供1N盐酸溶液进行活化，提供1.2N的碱溶液进行中和，检测时必须使用中和后的样品。标准品无需加酸活化。

细胞培养上清的活化及稀释：取100μl样品，加入20μl 1N的HCl，混匀后室温孵育10分钟。随后再加入20μl 1.2N的NaOH进行中和。为了计算方便，再加入60μl的1X标准品稀释液，混匀即可，此时样品相当于稀释了2倍。

血清和血浆样品的活化及稀释：取40μl样品，加入20μl 1N的HCl，混匀后室温孵育10分钟。随后再加入20μl 1.2N 的NaOH进行中和。因不同的血清和血浆样品稀释比例不一样，一般稀释范围在18-60倍，如无明确范围，建议从20倍开始稀释。即在中和后的样品中加入720μl的1X标准品稀释液，混匀即可，此时样品相当于稀释了20倍。

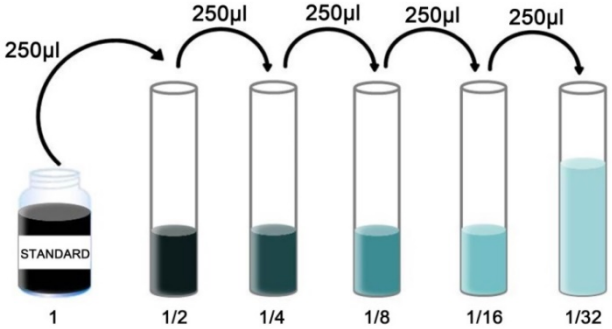

图2. 标准品倍比稀释示意图。按标准品(STANDARD)标签上标注体积加入标准品稀释液溶解并混匀后的浓度为标准品的起始浓度。其它的倍比稀释后的浓度依次为起始浓度的1/2、1/4、1/8、1/16和1/32。

3. 洗涤方法

自动洗板机或手工洗板：每孔洗涤液为300μl，注入与吸出间隔15-30秒。洗板5次。最后一次洗板完成后将板倒扣在厚吸水纸上适当用力拍干。

4. 实验过程需自备的材料和仪器

a. 不同规格的移液枪及相应的吸头
b. 酶标仪
c. 自动洗板机(如果没有也可以手工洗板)
d. 去离子水或双蒸水

5. 操作步骤

a. 计算并确定一次实验所需的预包被板条数，取出所需板条放置在96孔框架内，暂时用不到板条请放回铝箔袋密封，保存于4°C。
b. 每次实验都需配制标准品并绘制出标准曲线，同时建议设置本底较正孔，即空白孔，设置方法为该孔只加TMB溶液和终止液。
c. 分别将中和并稀释后的样品或不同浓度标准品按照100μl/孔加入相应孔中，用封板膜(透明)封住反应孔，室温孵育120分钟。如果检测时样品中TGF-β1浓度过高，超过标准曲线最高点，请加大稀释倍数后重新稀释检测。请注意记录好样品的稀释倍数。

   注意：请先查阅相关文献确定样品中待检测蛋白的大致浓度，如果该浓度大于或者小于本试剂盒的最高或者最低标准品浓度，请适当稀释或浓缩后再进行检测。
d. 洗板5次，且最后一次置于厚吸水纸上拍干。
e. 加入生物素化抗体100μl/孔(注：此生物素化抗体已经预先配制好，可以直接使用，不必再进行稀释)。用封板膜(透明)封住反应孔，室温孵育60分钟。
f. 洗板5次，且最后一次置于厚吸水纸上拍干。
g. 加入辣根过氧化物酶标记Streptavidin 100μl/孔(注：此辣根过氧化物酶标记Streptavidin已经预先配制好，可以直接使用，不必再进行稀释)。用封板膜(白色)封住反应孔，室温避光孵育20分钟。室温偏低时(低于25°C)，需要适当延长孵育时间。
h. 洗板5次，且最后一次置于厚吸水纸上拍干。
i. 加入显色剂TMB溶液100μl/孔，用封板膜(白色)封住反应孔，室温避光孵育15-20分钟。室温偏低时需要适当延长孵育时间，此时可以孵育至标准品和样品出现非常显著的颜色变化，若样品中蛋白浓度足够高，也会出现显著的颜色变化。
j. 加入终止液50μl/孔，混匀后立即测量A450值。

6. 结果分析

a. 复孔的值通常在20%的差异范围内结果才有效，复孔平均值可作为测量值。
b. 每个标准品或样品的吸光度值应减去本底校正孔的吸光度值(如果没有做校正孔，则不需要减去)。
c. 绘制标准曲线。以标准品浓度为横坐标，A450值为纵坐标，以平滑线连接各标准品的坐标点。通过样品的吸光度值和标准曲线计算出样品的相应浓度。

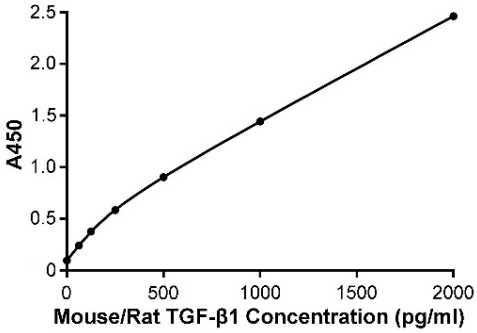

图3. Mouse/Rat TGF-β1 ELISA Kit的标准曲线。实测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

d. 若样品OD值高于标准曲线上限，应适当稀释后重新测定，计算浓度时需注意乘以样品的稀释倍数。

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
PT878	Mouse/Rat TGF-β1 ELISA Kit	96次
PT880	Human TGF-β1 ELISA Kit	96次

使用本产品的文献：

1. Hui Han,Xiaodan Fu,Jiao Huang,Xianfeng Zhang,Jianyi Yu. PD-1/PD-L1 affects Graves progression through lymphocytes on the proliferation, apoptosis and inflammatory cytokine secretion of thyroid follicular epithelial cells. J Toxicol Sci. 2020;45(11):701-711.;doi: 10.2131/jts.45.701.

Version 2023. 03.01