Rabbit TGF-β1 检测试剂盒
（酶联免疫吸附法）

产品货号：PCDBA0105

规格：96T / 盒

检测范围：15.6 pg/ml—1000pg/ml

工作原理

Transforming Growth Factor-beta 1 (TGFβ1) 是一种氨基酸数目为 112 个，分子量 25KDa 的二聚体蛋白质。在各种属间高度保守，例如小鼠和大鼠、兔等有完全相同的氨基酸序列。几乎所有细胞都有 TGFβ1 的受体，其对细胞的生长、分化的影响是非常广泛的。总之，间质来源细胞受 TGF-β1 的刺激，而肝细胞、T、B 淋巴细胞、角化上皮和很多内皮细胞受 TGF-β1 的抑制作用。TGF-β1 在很多组织的生长和分化过程中发挥着基础性作用。本试剂盒所用标准品为重组 TGF-β1，分子量 25KDa

本试剂盒采用的是双抗体夹心法。预包被的 TGF-β1 抗体和检测相抗体与样本中的 TGFβ1 抗原蛋白形成“三明治”结构，反应体系中加入生物素放大系统，以在增加反应的强度和灵敏度。结果判读模式利用 TMB 显色底物与 HRP 酶反应，形成蓝色，并在 TMB 终止液（H2SO4）的反应下转变成黄色，利用酶标仪判读波长，获取分光光度 OD 值，通过对 OD 值与浓度值的正相关关系，换算出样本中的 TGF-β1 的浓度。

试剂盒组份列表

内容	规格	数量
Rabbit TGF-β1 预包被板	96T / 板	1 板
Rabbit TGF-β1 重组抗原标准品	10ng / 支	2 支
抗 Rabbit TGF-β1 生物素标记抗体（100X）	130ul / 支	1 支
SA-HRP（100X）	130ul / 支	1 支
样品稀释液	20ml / 瓶	1 瓶
抗体稀释液	12ml / 瓶	1 瓶
SA-HRP 稀释液	12ml / 瓶	1 瓶
TMB 显色液	10ml / 瓶	1 瓶
TMB 终止液	10ml / 瓶	1 瓶
洗涤液（25X）	20ml / 瓶	1 瓶
封板膜	张	4 张

使用前请先检查试剂盒中的试剂组份和数量是否与本表格内容一致

实验涉及设备

1. 96 孔酶标分析仪
2. 37℃恒温培养箱
3. 可调节移液器 / 多通道移液器及吸头
4. 去离子水（用于稀释洗涤液 25X，稀释至 1X 使用）

注意事项

1. TMB 显色液为无色透明液体，若发现颜色异常或出现浑浊度，请与我司联系；
2. 严格避免操作过程中酶标板的干燥，预防导致板孔的蛋白活性丢失或引起假阳性；
3. 为避免交叉污染，请勿重复使用吸头或试管；
4. 禁止使用不同批次的试剂盒内试剂组份；
5. 使用前计算好需要的酶标板条数量，剩余数量请及时放置 2～8℃干燥保存；
6. 封板膜因粘性较强，以便更好的封闭板孔，在粘贴和揭开时，请勿过力，防止孔内液体因急剧震荡而溅出；
7. 试剂盒中的浓缩液在使用前需提前（1 小时以内）配制成工作液；
8. 试剂盒中的各组分应在使用前恒温至室温。

样品的活化

细胞上清液：100ul 样本中加入 20ul 样本活化剂 A 液，混匀后静置 10 分钟后再加入 20ul 样本活化剂 B 液，混匀；

血清：40ul 样本中加入 20ul 样本活化剂 A 液，混匀后静置 10 分钟后再加入 20ul 样本活化剂 B 液，混匀。

注意：

1. 试剂盒中的 TGF-β1 为重组蛋白，无需活化；
2. 最终浓度计算时，应考虑活化剂的加入导致的样品稀释。

试剂的准备和保存

一、 Rabbit TGF-β1 重组抗原标准品的稀释和使用：

1.1 取 1ml 样品稀释液加入 1 支标准品冻干品管中，盖好后静置 10min 以上，然后反复搓揉至充分溶解，获得浓度 10000pg/ml 的 TGF-β1 标准品溶液；

1.2 配制 1000pg/ml 标准品溶液：取 100ul 10000pg/ml 的标准品液，加入 900ul 样品稀释液，混匀后，获得 1000pg/ml 标准品液；

1.3 配制 15.6～500pg/ml 的标准品液：准备 6 只 EP 管，分别加入 0.3ml 样品稀释液，并分别标记好浓度：500pg / ml、250pg / ml、125pg / ml、62.5pg / ml、31.3pg / ml、15.6pg / ml。取 0.3ml 的 1000pg/ml 浓度的标准液进入 500pg/ml 管中，充分混匀；同样取出 0.3ml 液体，加入下一管中，以此类推，

注意：已稀释 Rabbit TGF-β1 标准品溶液（10ng/ml），需要在 12h 以内使用完，若时间较长（2 天以内），则放置-20℃保存，但不得反复冻融

二、 抗 Rabbit TGF-β1 生物素抗体工作液的准备：

2.1 根据每孔需要 100ul 计算总的用量（实际配制时应多配制 100-200ul）。

2.2 按抗 Rabbit TGF-β1 生物素抗体（100X）1ul 加抗体稀释液 99ul 配制工作液，混匀。

三、 SA-HRP 工作液的准备：

3.1 根据每孔需要 100ul 计算总的用量（实际配制时应多配制 100-200ul）。

3.2 按 SA-HRP（100X）1ul 加 SA-HRP 稀释液 99ul 配制工作液，混匀。

实验步骤

1. 根据待检测样品数量，计算好所需使用的板孔数量，增加 1 孔为 TMB 显色空白 对照孔。总数=样本数+7（标准品）+1（空白孔）。做复孔检测的数量 X2.其余板条及时包装好放回 2-8℃干燥保存；
2. 重组抗原标准品，利用样品稀释液稀释出浓度梯度为： 1000pg/ml、500pg/ml、250pg/ml、 125pg/ml、62.5pg/ml、31.3pg/ml、15.6pg/ml；
3. 在第一排中依次加入标准品浓度梯度，第一孔为空白孔（样品稀释液）100ul / 孔；依次加入待检测样品 100ul / 孔（若样本浓度过高可利用样品稀释液稀释，计算时检测结果乘以稀释倍数）；
4. 利用封板膜封好，37℃反应 90min；
5. 甩去酶标板中的液体，并利用吸水纸拍干（不洗涤），加入准备好的抗 Rabiit TGF-β1 生物素抗体工作液**（空白孔不加）**。100ul / 孔，贴好封板膜，37℃反应 60min；
6. 利用 1X 洗涤液 300ul / 孔洗板 3 次；
7. 将 SA-HRP 工作液按照 100ul / 孔加入板孔**（空白孔不加）**，贴好封板膜，37℃ 反应 30min；
8. 利用 1X 洗涤液 300ul / 孔洗板 5 次；
9. 90ul / 孔加入 TMB 显色液，37℃避光反应 7～15min （根据实验室具体环境确认最佳显色时间，可根据肉眼判断标准品前 3 个孔出现明显梯度蓝色）
10. 100ul / 孔加入 TMB 终止液，孔内液体颜色由蓝色变为黄色；
11. 用酶标仪在 450nm 光波处检测 OD 值；
12. 计算时，以标准品浓度梯度作为 X 轴，OD 值（减去空白孔值）作为 Y 轴，制作标准曲线，计算出样品值（减去空白孔值）对应的浓度值。

注意：在样本加入前处理时，涉及的样本稀释比例，在此基础上需要按照对应倍数换算回来。

上海磐超生物科技有限公司
上海市闵行区沈杜公路 3872 号孵源发展 F 楼 C401 室　　电话：021-31550304
邮箱：techsupport@pc-biotech.com　　网址：www.pc-biotech.com