
产品信息和操作指南

Mouse TGF- β 1 预包被 ELISA kit

Cat# : DKW12-2710-048 / DKW12-2710-096

本试剂盒专用于科研，而非用于诊断

**Mouse TGF- β 1
DKW12-2710**

目 录

产品简介.....	1
知识背景.....	1
试剂盒提供的试剂.....	2
需要实验者自行准备的试剂与仪器.....	2
注意事项.....	3
试剂的配制.....	6
操作过程.....	8
结果分析.....	10
试剂盒的保存.....	10
操作步骤一览表.....	11
参考文献.....	12
ELISA 测定中可能会出现的问题及解决方法.....	13
预包被 ELISA 试剂盒系列产品.....	16

1、 产品简介:

达优[®]小鼠 TGF- β 1 ELISA 试剂盒是通过酶联免疫吸附技术,体外定量检测小鼠血清、血浆、缓冲液或细胞培养液中的 TGF- β 1,可同时检测天然的和重组的 TGF- β 1。本试剂盒为预包被板,整个过程孵育时间不超过 4 小时,洗涤 12 次。本试剂盒专用于科研,而非用于诊断。

使用前请仔细阅读说明书并检查试剂盒组分,若有任何疑问请与达科为生物工程有限公司联系, E-mail: RD@dakewe.com.

检测范围: 1000-15.6 pg/mL

灵敏度: 5 pg/mL

重复性: 板内、板间变异系数均 $<10\%$ 。

2、 知识背景:

转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 能使正常的成纤维细胞的表型发生转化,具有细胞抑制和促进生长双重作用。TGF- β 1 分子量 25kDa, 非糖基化同型二聚体蛋白, 由二硫键连接。TGF- β 1 基因结构具有高度保守性,人和小鼠 TGF- β 1 的同源性高达 99% (1-4)。TGF- β 1 在治疗伤口愈合,促进软骨和骨修复以及通过免疫抑制治疗自身免疫性疾病和移植排斥等方面发挥重要作用 (5)。

3、 试剂盒提供的试剂：

试剂	规格	配制
Cytokine standard	2/1 瓶*	干粉状，按瓶上说明操作
Biotinylated antibody	2/1 瓶*	1: 100 用 Dilution buffer R (1×) 稀释
Streptavidin-HRP	2/1 瓶*	1: 100 用 Dilution buffer R (1×) 稀释
Dilution buffer R (1×)	3/2 瓶*	即用型
Washing buffer (50×)	1 瓶	1 : 50 用蒸馏水稀释
TMB	1 瓶	即用型
Stop solution	1 瓶	即用型
Precoated ELISA plate	8×12 或 8×6*	即用型
封板膜	2/1 张*	即用型
说明书	1 份	

*: 96/48 Tests

4、 需要实验者自行准备的试剂与仪器：

1. 酶标仪（建议参考仪器使用说明提前预热）
2. 微量加液器及吸头：P10，P50，P100，P200，P1000
3. 蒸馏水或去离子水
4. 全新滤纸
5. 旋涡振荡器和磁力搅拌器
6. 37℃温箱

5、 注意事项：

1. 试剂应按瓶上标签说明储存，使用前 **室温平衡** 20-30 分钟。
实验前室温平衡对 Washing buffer (50×)、Dilution buffer R (1×)、Precoated ELISA plate 和 TMB 有重要意义。
2. 冻干标准品冰上操作，按照标签说明溶解干粉，**充分混匀**，按照一次使用量分装，-20℃贮存，避免反复冻融。
3. 预包被板条使用前，请恢复到室温后再打开外包装袋，实验中不用的板条立即放回包装中，**密闭封口**，4℃可保存 1 个月。其余不用试剂应包装好或盖好。
4. Washing buffer (50×) 在 4℃保存可能有**结晶析出**，使用前务必使结晶完全溶解后（如加热、平衡温度后混匀等）再配置成 Washing buffer (1×) 工作液。
5. HRP 和检测抗体体积量很小，使用前请**高速短暂离心**管子，以使管壁或瓶盖的液体沉积到管底。
6. 实验操作中请使用一次性的吸头，避免交叉污染。
7. 使用前检查试剂盒内各种试剂；试剂稀释、加样和中止反应充分混匀或者摇匀对实验结果尤为重要，最好使用低速频率振荡器或者反应过程中每 15 分钟手工摇匀一次。
8. 实验板孔加入试剂的顺序应一致，以保证所有反应孔的孵育时间一致。
9. 使用洁净的塑料容器盛装洗涤液。
10. 洗涤过程中反应孔中残留的洗涤液应在**滤纸**上充分拍干，滤

纸上看不到水印。勿将滤纸直接放入反应孔中吸水。

11. TMB 对光敏感，避免长时间暴露于光下，避免金属接触影响结果。**有毒，避免用手接触!** 准备使用的 TMB 若变为蓝色，表明 TMB 已经污染，请丢弃。请在终止反应后 10 分钟内读取 OD 值。
12. 请严格按照说明书标明的时间和温度进行孵育。冬季室内温度偏低，请使用**恒温箱或培养箱孵育**为好。
13. 试剂盒在保质期内使用，且不同批号试剂不要混用。
14. 1000 pg/mL 以上的结果为非线性的，根据此标准曲线无法得到精确的结果。大于 1000 pg/mL TGF- β 1 的样品应以 Dilution buffer R (1 \times) 稀释后重做。在结果分析时，结合考虑相应的稀释度。
15. 特异性：不与鼠其它细胞因子反应。鼠 TGF- β 1 与人、牛、猪、马和山羊的 TGF- β 1 有一定交叉反应。
16. 生物样品中的 TGF- β 1 通常以无活性的形式存在。在**检测 TGF- β 1 活性前必须活化**以释放 TGF- β 1 的活性。活化的方法主要有两种：加热活化和酸化活化。

加热活化：样品用 Dilution buffer R (1 \times) 稀释 10 倍，置 80 $^{\circ}$ C 水浴中 8 分钟，取出冷却 5 分钟，2 小时内检测。

酸化活化：

血清、血浆：20 μ L 1N HCl 加入 40 μ L 样品中，混匀，室温孵育 10-30 分钟。再加入 20 μ L 1.2 N NaOH，混匀。

最后加入 320 μL Dilution buffer R (1 \times), 混匀后检测。

注意：样品被稀释了 10 倍！

细胞培养上清：20 μL 1N HCl 加入 100 μL 样品中，混匀，室温孵育 10-30 分钟。再加入 20 μL 1.2 N NaOH，混匀后加入 60 μL Dilution buffer R (1 \times), 立即检测。

注意：样品被稀释了 2 倍！

6、试剂的配制：

1. 提前 20 分钟将 **Washing buffer (50×)** 和即用溶液从试剂盒中取出，以平衡至室温。
2. **Cytokine standard:** Standard 为冻干粉。先按标签说明将冻干粉溶解，静置 5-10 分钟，再用 **Dilution buffer R (1×)** 稀释到推荐检测浓度。标准品溶解后混匀，准确倍比稀释，严格操作非常重要。标准品的倍比稀释最好在进口的或者硅化的 EP 管中完成，减少非特异性吸附。在实验孔内进行倍比稀释时，注意操作规范，枪头勿刮划预包装的孔底。母液若没有用完请按照一次用量分装，-20℃ 保存。
* 推荐标准品浓度梯度为： 1000 pg/mL、500 pg/mL、250 pg/mL、125 pg/mL、62.5 pg/mL、31.25 pg/mL、15.6 pg/mL。
3. **Biotinylated antibody:** 1 : 100 用 **Dilution buffer R (1×)** 稀释，混匀制成 **1×antibody** 工作液。
4. **Streptavidin-HRP :** 1 : 100 用 **Dilution buffer R (1×)** 稀释，混匀制成 **1×HRP** 工作液。

5. Washing buffer (50×): 1 : 50 用蒸馏水稀释。

6. 即用型溶液

➤ **Dilution buffer R (1×) :** 用于稀释 **Biotinylated antibody**、**Streptavidin-HRP** 和 **Cytokine standard**。

➤ **TMB**

➤ **Stop solution**

7、操作过程：

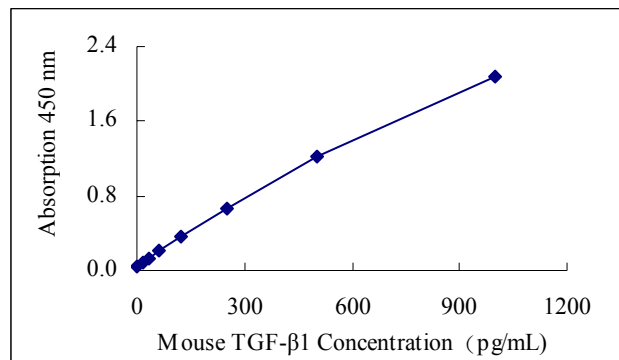
1. 使用前，将所有试剂充分混匀，避免产生泡沫。
2. 根据实验孔（空白和标准品）数量，确定所需的板条数目。样品（含标准品）和空白都应做复孔。
3. 加样：100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加入稀释后的 Cytokine standard 至标准品孔，100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加入样品至样品孔，100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加 Dilution buffer R（1 \times ）入空白对照孔。盖上封板膜，37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 90 分钟。
4. 洗板：扣去孔内液体，300 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加入 1 \times washing buffer；停留 1 分钟后弃去孔内液体。重复 4 次，每一次在滤纸上扣干。
5. 加检测抗体：100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加入稀释后的 Biotinylated antibody。盖上封板膜，37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 90 分钟。
6. 洗板：重复步骤 4。
7. 加酶：100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加入 Streptavidin-HRP。盖上封板膜，37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 分钟。
8. 洗板：重复步骤 4。
9. 显色：100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加入 TMB，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光温育 5-30 分钟之间，根据孔内颜色的深浅（深蓝色）来判定终止反应。通常显色 10-20 分钟可以达到很好的效果。

10. 终止反应: 100 μ L/well 迅速加入 Stop solution 终止反应。

11. 读板: 终止后 10 分钟内, 用检测波长(measurement wavelength) 450 nm 读值。推荐用双波长即检测波长 (measurement wavelength) 450 nm、参考波长或校正波长 (reference wavelength) 610-630 nm 同时读板, 测量结果会更准确。

8、结果分析：

1. 有两种设定空白对照的方案：
 - 1) 将 TMB 空白显色孔设为对照。所有的标准品和样品的吸光值减去空白孔的吸光值后，在坐标纸上画出曲线，以吸光值作为纵坐标，以浓度作为横坐标。
 - 2) 将零孔设为对照。得到的数据可以直接在坐标纸上画出曲线。
2. 根据样品的吸光值在坐标上找出对应的浓度。用户也可以使用各种应用软件来计算。若样品 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。



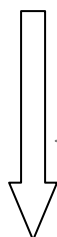
注意：本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线来计算标本含量。

9、试剂盒的保存：

4°C 可稳定保存 12 个月。

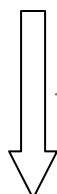
10、操作步骤一览表：

加样品或配好的标准品，设置对照，**100 μ L/well**



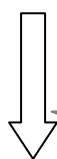
37°C 温育 90 分钟；
洗 4 次

加生物素标记的抗体，**100 μ L/well**



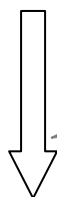
37°C 温育 90 分钟；
洗 4 次

加亲和素-**HRP** 标记物，**100 μ L/well**



37°C 温育 30 分钟；
洗 4 次

加 **TMB** 显色液，**100 μ L/well**



37°C 避光 5-30 分钟

加 **Stop solution** **100 μ L/well**，终止反应



10 分钟内读板

在 $\lambda=450 \text{ nm}$ 处读取吸光值

11、参考文献

- (1) Lawrence, D.A. (1996) *Eur. Cytokine Netw.* 7:363.
- (2) Cox, D.A. and T. Maurer (1997) *Clin. Immunol. Immunopathol.* 83:25.
- (3) Alevizopoulos, A. and N. Mermoud (1997) *BioEssays* 19:581.
- (4) Kingsley, D.M. (1994) *Genes Dev.* 8:133.
- (5) Lavery HG. *Cytokine Growth Factor Rev.* (2009) Aug 3.

12、ELISA 测定中可能会出现的问题及解决方法

问 题	可能的原因	解决方法
1. 非常弱 的结果	(1) 温育的时间或温度不够； (2) 显色反应时间太短； (3) 所用配制缓冲液的蒸馏水有问题； (4) 加入抗体/酶的稀释液浓度太低； (5) 酶标仪滤光片不正确； (6) 不正确的试剂储存方式； (7) 试剂盒没有充分平衡； (8) 移液器吸液量不足，吸嘴内壁挂水太多或内壁不清洁。	a. 校正温育箱温度； b. 校正定时钟准确定时； c. 使用新鲜合格的蒸馏水； d. 按照说明书保存试剂盒和准确配制工作液； e. 试剂室温平衡至少 20 分钟，确保所有试剂已平衡至室温（约 25℃）； f. 校正移液器，吸嘴要配套，装吸嘴时要紧密，吸嘴内壁要清洁，最好一次性使用。

<p>2. 标准曲线和测定的重复性差</p>	<p>这是典型的由测定操作引起的问题，包括</p> <ul style="list-style-type: none"> (1) 加样本及试剂量不准；孔间不一致； (2) 加样过快，孔间发生污染； (3) 加错样本； (4) 加样本及试剂时，加在孔壁上部非包被区； (5) 不同批号试剂盒中组分混用； (6) 温育时间、洗板、显色时间不一致； (7) 孔内污染杂物； (8) 酶标仪滤光片不正确； (9) 试剂/样品没有混匀； (10) 血清标本未完全凝固即加入，反应孔内出现纤维蛋白凝固或残留血细胞，易出现假阳性反应等。 	<ul style="list-style-type: none"> a. 重复某一样品时，加样时间尽可能与第一次接近； b. 重复测定标本，操作条件、人员等应尽可能与上次保持一致，以排除这些因素造成的不一致的可能性； c. 样品稀释前应充分混匀； d. 尽可能使用同一移液器并装紧吸嘴。
<p>3. 白板 (阳性对照不显色)</p>	<ul style="list-style-type: none"> (1) 漏加酶结合物； (2) 洗板液配制中出现问题，如量筒不干净，含酶抑制物（如叠氮钠）等； (3) 添加的试剂错误或者被遗漏； (4) 试剂过期； 	<ul style="list-style-type: none"> a. 请按说明书所示稀释倍数配制； b. 注意不要漏加； c. 每次加液前均应核对标签。

<p>4. 空白背景高</p>	<p>(1) 洗板不干净; (2) 显色液变质; (3) 试剂过期; (4) 不正确的试剂稀释液, 如加酶的浓度过高; (5) 蒸馏水受酶等污染; (6) 试剂混用; (7) 培养箱温度超过 37°C 或反应时间过长。</p>	<p>a. 浓缩洗液准确配制; b. 50 倍浓缩洗涤液如有结晶则应让结晶于室温全部溶解后再量取稀释; c. 充分洗涤, 彻底拍干; d. 加样或加酶拍板的滤纸应弃去不用, 不要反复使用, 否则易造成污染; e. 吸嘴尽可能一次性使用; f. 使用新鲜蒸馏水; g. 不同批号试剂勿混用; h. 请按说明书所示稀释倍数配制; i. 显色反应时间适当缩短。</p>
-----------------	---	---

13、预包被 ELISA 试剂盒系列产品

达优®小鼠 ELISA 试剂盒

DKW12-2000-048	Mouse IFN- γ ELISA kit (预包被减步法)	48T
DKW12-2000-096		96T
DKW12-2011-048	Mouse IL-1 α ELISA kit (预包被减步法)	48T
DKW12-2011-096		96T
DKW12-2012-048	Mouse IL-1 β ELISA kit (预包被减步法)	48T
DKW12-2012-096		96T
DKW12-2020-048	Mouse IL-2 ELISA kit (预包被减步法)	48T
DKW12-2020-096		96T
DKW12-2040-048	Mouse IL-4 ELISA kit (预包被减步法)	48T
DKW12-2040-096		96T
DKW12-2050-048	Mouse IL-5 ELISA kit (预包被减步法)	48T
DKW12-2050-096		96T
DKW12-2060-048	Mouse IL-6 ELISA kit (预包被减步法)	48T
DKW12-2060-096		96T
DKW12-2100-048	Mouse IL-10 ELISA kit (预包被减步法)	48T
DKW12-2100-096		96T
DKW12-2120-048	Mouse IL-12 p70 ELISA kit (预包被减步法)	48T
DKW12-2120-096		96T
DKW12-2123-048	Mouse IL-12/IL-23 p40 ELISA kit (预包被减步法)	48T
DKW12-2123-096		96T
DKW12-2170-048	Mouse IL-17A ELISA kit (预包被减步法)	48T
DKW12-2170-096		96T
DKW12-2220-048	Mouse IL-22 ELISA kit (预包被)	48T
DKW12-2220-096		96T
DKW12-2710-048	Mouse TGF- β 1 ELISA kit (预包被)	48T
DKW12-2710-096		96T
DKW12-2720-048	Mouse TNF- α ELISA kit (预包被减步法)	48T
DKW12-2720-096		96T
DKW12-2734-048	Mouse VEGF-A ELISA kit (预包被)	48T
DKW12-2734-096		96T
DKW12-2820-048	Mouse IgE ELISA kit (预包被)	48T
DKW12-2820-096		96T
DKW12-2739-048	Mouse MCP-1 ELISA kit (预包被)	48T
DKW12-2739-096		96T

达优[®]人 ELISA 试剂盒

DKW12-1000-048	Human IFN- γ ELISA Kit (预包被减步法)	48T
DKW12-1000-096		96T
DKW12-1012-048	Human IL-1 β ELISA Kit (预包被减步法)	48T
DKW12-1012-096		96T
DKW12-1020-048	Human IL-2 ELISA Kit (预包被减步法)	48T
DKW12-1020-096		96T
DKW12-1040-048	Human IL-4 ELISA Kit (预包被)	48T
DKW12-1040-096		96T
DKW12-1050-048	Human IL-5 ELISA Kit (预包被减步法)	48T
DKW12-1050-096		96T
DKW12-1060-048	Human IL-6 ELISA Kit (预包被减步法)	48T
DKW12-1060-096		96T
DKW12-1080-048	Human IL-8 ELISA Kit (预包被减步法)	48T
DKW12-1080-096		96T
DKW12-1100-048	Human IL-10 ELISA Kit (预包被减步法)	48T
DKW12-1100-096		96T
DKW12-1120-048	Human IL-12p70 ELISA Kit (预包被减步法)	48T
DKW12-1120-096		96T
DKW12-1170-048	Human IL-17A ELISA Kit (预包被)	48T
DKW12-1170-096		96T
DKW12-1220-048	Human IL-22 ELISA Kit (预包被减步法)	48T
DKW12-1220-096		96T
DKW12-1325-048	Human sIL-2R ELISA Kit (预包被减步法)	48T
DKW12-1325-096		96T
DKW12-1354-048	Human CD54/sICAM-1 ELISA Kit (预包被减步法)	48T
DKW12-1354-096		96T
DKW12-1406-048	Human CD106/sVCAM-1 ELISA Kit (预包被)	48T
DKW12-1406-096		96T

DKW12-1530-048	Human Adiponectin/Acrp30 ELISA Kit (预包被)	48T
DKW12-1530-096		96T
DKW12-1540-048	Human CRP ELISA Kit (预包被)	48T
DKW12-1540-096		96T
DKW12-1710-048	Human TGF- β 1 ELISA Kit (预包被)	48T
DKW12-1710-096		96T
DKW12-1720-048	Human TNF- α ELISA Kit (预包被减步法)	48T
DKW12-1720-096		96T
DKW12-1730-048	Human GM-CSF ELISA Kit (预包被)	48T
DKW12-1730-096		96T
DKW12-1731-048	Human G-CSF ELISA Kit (预包被)	48T
DKW12-1731-096		96T
DKW12-1732-048	Human EGF ELISA Kit (预包被)	48T
DKW12-1732-096		96T
DKW12-1734-048	Human VEGF-A ELISA Kit (预包被)	48T
DKW12-1734-096		96T
DKW12-1739-048	Human MCP-1 ELISA Kit (预包被)	48T
DKW12-1739-096		96T
DKW12-1741-048	Human MIP-1 α ELISA Kit (预包被)	48T
DKW12-1741-096		96T
DKW12-1760-048	Human FGF basic ELISA Kit (预包被)	48T
DKW12-1760-096		96T
DKW12-1763-048	Human β -NGF ELISA Kit (预包被)	48T
DKW12-1763-096		96T
DKW12-1765-048	Human HGF ELISA Kit (预包被)	48T
DKW12-1765-096		96T
DKW12-1820-048	Human IgE ELISA Kit (预包被)	48T
DKW12-1820-096		96T
DKW12-1830-048	Human perforin ELISA Kit (预包被)	48T
DKW12-1830-096		96T

达优®大鼠 ELISA 试剂盒

DKW12-3000-048	Rat IFN- γ ELISA kit (预包被减步法)	48T
DKW12-3000-096		96T
DKW12-3012-048	Rat IL-1 β ELISA kit (预包被)	48T
DKW12-3012-096		96T
DKW12-3020-048	Rat IL-2 ELISA kit (预包被减步法)	48T
DKW12-3020-096		96T
DKW12-3040-048	Rat IL-4 ELISA kit (预包被)	48T
DKW12-3040-096		96T
DKW12-3060-048	Rat IL-6 ELISA kit (预包被)	48T
DKW12-3060-096		96T
DKW12-3100-048	Rat IL-10 ELISA kit (预包被减步法)	48T
DKW12-3100-096		96T
DKW12-3170-048	Rat IL-17A ELISA kit (预包被)	48T
DKW12-3170-096		96T
DKW12-3710-048	Rat TGF- β 1 ELISA kit (预包被)	48T
DKW12-3710-096		96T
DKW12-3720-048	Rat TNF- α ELISA Kit (预包被减步法)	48T
DKW12-3720-096		96T

ELISA 辅助试剂

DKW12-T010	TMB (ready-to-use, 即用型), 1 plate	10 mL
DKW-F1	ELISA 辅助试剂盒	96T

深圳市达科为生物工程有限公司
Dakewe Bioengineering Co., LTD
 (130101)