# Chicken TGF β 2 ELISA Kit

## 鸡转化生长因子 beta2 ELISA 试剂盒

**产品编号：** EK0981-CH

**规格：** 96T

**检测范围：** 31.2pg/ml→2000pg/ml。

**敏感性：** ＜1pg/ml。

**特异性：** 系统和 TGF β 3，TGF β 5 的交叉反应＜1%.

**保存：** 2-8℃（频繁使用时）； -20℃（长时间不用时）。

**有效期：** 6 个月(4℃)；12 个月（-20℃）。

**用途：** 用于体外定量分析血清、血浆、细胞裂解液或细胞培养上清。

### 工作原理

转化生长因子-β（transforming growth factor-β,TGF-β)是属于一组新近发现的调节细胞生长和分化的 TGF-β超家族。鸡 TGF-β1、TGF-β2 和 TGF-β3 的基因分别定位于染色体 19q3、1q41 和 14q24，均含有 7 个外显子，核苷酸序列有高度同源性，所编码的前体分子 C 端者有 9 个保守的 Cys，提示 TGF-β1、TGF-β2 和 TGF-β3 基因可能来自一个共同的祖先基因。

博士德所提供的鸡 TGFβ2 ELISA Kit 是典型的夹心法酶联免疫吸附测定试剂盒（Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay, ELISA）。预先包被的抗体和检测相抗体都是亲和纯化多克隆抗体。检测相抗体经生物素（biotin）标记。样品和生物素标记抗体先后加入酶标板孔反应后，PBS 或 TBS 洗涤。随后加入过氧化物酶标记的亲和素反应；经过 PBS 或 TBS 的彻底洗涤后用底物 TMB 显色。TMB 在过氧化物酶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鸡 TGF β 2 呈正相关。

### 试剂盒中内容(96 孔)

| 内容 | 规格 | 数量 |
|---|---|---|
| 预包被抗鸡 TGFβ2 抗体的 96 孔板 | 96T | 1 板 |
| 重组鸡 TGFβ2 冻干标准品 | 10ng/管 | 2 管 |
| 生物素标记抗鸡 TGFβ2 (100X) | 100ul | 1 管 |
| 亲和素-过氧化物酶复合物（ABC）（100X） | 100ul | 1 管 |
| 样品稀释液 | 30ml | 1 瓶 |
| 抗体稀释液 | 12ml | 1 瓶 |
| ABC 稀释液 | 12ml | 1 瓶 |
| TMB 显色液 | 10ml | 1 瓶 |
| 终止液 | 10ml | 1 瓶 |
| 洗涤缓冲液(25X) | 20ml | 1 瓶 |
| 封板膜 | | 4 张 |
| 活化剂 A、B 液 | 1.5ml | 各 2 支 |

*注意：使用前请检查试剂盒中试剂的标签和数量与表格是否一致*

## 需要而未提供的试剂和器材

1. 标准规格酶标仪。
2. 自动洗板机。
3. 恒温箱
4. 系列可调节移液器及吸头，一次检测样品较多时，最好用多通道移液器。
5. 干净的试管和 Eppendof 管。
6. 用去离子水将 25X 洗涤缓冲液稀释 25 倍，成 1X 洗涤缓冲液

## 注意事项

1. 使用前 TMB 显色液应为无色透明溶液，若发现颜色异常，请及时与厂家联系。
2. 用户在初次使用试剂盒时，应将各种试剂管离心数分钟，以便试剂集中到管底。
3 要严格避免操作过程中酶标板干燥。干燥会使酶标板上生物成份迅速失活。
4. 为免交叉污染，要避免重复使用手中的吸头和试管。
5. 禁止混用不同批次试剂盒内的试剂。
6. 本公司提供的 96 孔酶标板是单条可拆型酶标板，用户可按需求使用；剩余的酶标板请按保存条件贮存。
7. 揭封板膜和覆盖封板膜时应避免用力过大导致液体溅出。

## 洗板方法

手工洗板方法：吸去（不可触及板壁）或甩掉酶标板内的液体；在实验台上铺垫几层吸水纸，酶标板朝下用力拍几次；将 1X 洗涤缓冲液至少 300ul 注入孔内，浸泡 1-2 分钟。根据需要，重复此过程数次。

自动洗板：如果有自动洗板机，应在熟练使用后再用到正式实验过程中。

## 样品的准备和保存

样品如果不立即分析，应分装后冷冻保存，且避免反复冻融。

细胞培养上清——离心去除沉淀，立即分析或分装后-20℃冷冻保存。

注意：细胞培养所用的牛血清可能含有高含量的 TGFβ2，应尽量避免使用。不能避免时，应做好适当的对照。

血清——用干净试管收集血液，室温凝固 30 分钟后，2-8℃放置过夜，以利 TGFβ2 的完全释放。离心 1000×g 15 分钟，收集血清。立即分析或分装后-70℃冷冻保存。

血浆——采用 EDTA 抗凝，抽血后 30 分钟内在 2-8℃离心 2000×g 20 分钟。立即分析或分装后-20℃冷冻保存。

细胞裂解液——对于贴壁细胞，去除培养液，用 PBS、生理盐水或无血清培养液洗一遍。加入适量裂解液，用枪吹打数下，使裂解液和细胞充分接触。通常 10 秒后，细胞就会被裂解。对于悬浮细胞，离心收集细胞，用 PBS、生理盐水或无血清培养液洗一遍。加入适量裂解液，用枪吹打把细胞吹散，用手指轻弹以充分裂解细胞。充分裂解后，10000—14000g 离心 3-5 分钟，取上清。立即分析或分装后-20℃冷冻保存。

## 样品的活化

细胞上清等：100ul 样品中加 20ulA 液，10 分钟后再加 20ulB 液。PH7.0-7.6。

血清：40ul 样品中加 20ulA 液，10 分钟后再加 20ulB 液。PH7.0-7.6。
重组 TGF β 2 不需活化。计算时应考虑活化所至样品稀释。

### 样品稀释的一般原则

用户须估计样品待测因子的含量，决定适当的稀释倍数，以使稀释后样品中待测因子的浓度处于 ELISA 试剂盒的最佳检测范围。根据待测因子含量高、中、低的不同，分别采取不同的稀释方案：
高——指待测因子在 20-200ng/ml。一般按 1：100 稀释。297ul 样品稀释液加 3ul 样品。
中——指待测因子在 2-20ng/ml。一般按 1：10 稀释。225ul 样品稀释液加 25ul 样品。
低——指待测因子在 31.2→2000pg/ml。按 1：2 稀释。100ul 样品稀释液加 100ul 样品。
特低——指待测因子≤31.2pg/ml。样品一般不做稀释，或按 1：2 稀释。

### 试剂的准备和保存

A. 鸡 TGF β 2 标准品的稀释和使用：在使用前 2 小时内准备。
试剂盒提供 2 管标准品，每管 10ng，每次使用 1 管。

1. 配制 10,000pg/ml 标准品：取 1ml 样品稀释液加入标准品管内，盖好后静置 10 分钟以上，然后反复颠倒/搓动以助溶解。
2. 配制 2000pg/ml 标准品：取 0.2ml 10,000pg/ml 的标准品加入有 0.8ml 样品稀释液的 Eppendorf 管中，混匀，做上标记。
3. 配制 1000pg/ml→31.2pg/ml 标准品：准备 6 只 Eppendorf 管，每管加 0.3ml 样品稀释液，分别标记上 1000pg/ml ，500pg/ml，250pg/ml，125pg/ml，62.5pg/ml，31.3pg/ml。取 0.3ml 2000pg/ml 的标准品加入标记 1000pg/ml 的管中，**混匀**后同样取出 0.3ml，加入下一只管中。余同此类推，直到最后一只样品管。

**注意**：已经稀释的标准品（10,000pg/ml），应在 12 小时内使用。-20℃冷冻保存条件下，2 天内可以使用,但不得反复冻融。

**B**. 生物素标记抗鸡 TGF β 2 抗体工作液的准备：在使用前 2 小时内准备。

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. 按 1ul 生物素标记抗鸡 TGF β 2 加抗体稀释液 99ul 的比例配制工作液。轻轻**混匀**。

**C**. 亲和素-过氧化物酶复合物（ABC）工作液的准备：在使用前 1 小时内准备。

1. 根据每孔需要 100ul 计算总的用量（实配时应多配制 100-200ul）。
2. 按 1ul 亲和素-过氧化物酶复合物（ABC）加 ABC 稀释液 99ul 的比例配制工作液。轻轻**混匀**。

## 操作程序

已稀释好的 ABC 和 TMB 显色液在加入酶标板孔前都应预先在 37℃中平衡至少 30 分钟。试剂或样品稀释时，**切不可忘记混匀**。每次检测都应该做标准曲线。用户须估计样品待测因子的含量，决定适当的稀释倍数。

1. 确定本次检测所需的已包被抗体的酶标板孔数目，并增加 1 孔作为 TMB 空白显色孔。总数=样品数+9；做双份检测时×2。其余重包装好放入冰箱中。
2. 将 2000pg/ml ，1000pg/ml ，500pg/ml，250pg/ml，125pg/ml，62.5pg/ml，31.3pg/ml 的

标准品各 100ul 依次加入一排 7 孔中，1 孔只加样品稀释液的作为零孔。对于鸡血清、血浆、细胞裂解液或细胞培养上清，直接加已用样品稀释液稀释的样品 100ul。

3. 酶标板加上封板膜，37℃反应 90 分钟。
4. 反应后用自动洗板机吸去酶标板内的液体；或甩去酶标板内液体，再对着吸水纸拍几下。**不洗**。
5. 将准备好的生物素抗鸡 TGF β 2 抗体工作液按每孔 100ul 依次加入（TMB 空白显色孔除外）。酶标板加上封板膜，37℃反应 60 分钟。
6. 1X 洗涤缓冲液洗涤 3 次，每次浸泡 1 分钟左右（每孔洗液至少 300ul）。
7. 将准备好的 ABC 工作液按每孔 100ul 依次加入（TMB 空白显色孔除外）。酶标板加上封板膜，37℃反应 30 分钟。
8. 1X 洗涤缓冲液洗涤 5 次，每次浸泡 1-2 分钟左右（每孔洗液至少 300ul）。
9. 按每孔 90ul 依次加入 TMB 显色液，37℃避光反应 20-25 分钟

（**注意**：显色时间供参考，因用户实验室条件差异，最佳显色时间会有所不同。此时肉眼可见标准品的前 3-4 孔有明显的梯度蓝色，后 3-4 孔差别不明显）。

10. 按每孔 100ul 依次加入终止液，此时蓝色立转黄色。
11. 用酶标仪在 450nm 测定 O.D.值。

有两种设定空白对照的方案：

（1）将 TMB 空白显色孔(**只加 TMB 显色液和终止液**)设为对照。所有的标准品和样品的吸光值减去 TMB 空白显色孔的吸光值后，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。所有的标准品和样品的吸光值减去零孔的吸光值后，得到的数据可以直接在坐标纸上画出曲线。

12. 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。**应记住由于样品稀释了 N 倍，其实际浓度应该×N。**

## 操作程序总结：

1. 加样品和标准品，37℃反应 90 分钟。不洗。
2. 加生物素标记抗体，37℃反应 60 分钟。1X 洗涤缓冲液洗涤 3 次。
3. 加 ABC，37℃反应 30 分钟。1X 洗涤缓冲液洗涤 5 次。
4. TMB37℃反应 20-25 分钟。
5. 加入终止液，读数。

## 典型数据

TMB37℃反应 20 分钟。

（数据供参考，不同用户最佳显色时间会有所不同）

| 浓度 | 0.0pg/ml | 31.2pg/ml | 62.5pg/ml | 125pg/ml | 250pg/ml | 500pg/ml | 1000pg/ml | 2ng/ml |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| O.D. | 0.068 | 0.144 | 0.184 | 0.304 | 0.536 | 0.884 | 1.545 | 2.345 |