Rabbit TGF-beta 3 ELISA Kit

产品编号 EK1103-RB
规格 96T
检测范围 31.2 pg/ml - 2,000 pg/ml
灵敏度 10 pg/ml
特异性 系统和其它细胞因子无交叉反应
样本类型 血清，血浆，尿液，细胞培养上清或细胞裂解液

检测原理 博士德所提供的兔 TGF-beta 3 ELISA Kit 是夹心法酶联免疫吸附测定试剂盒（Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay, ELISA）。用于定量检测样本中兔 TGF-beta 3 的蛋白含量。预先包被的抗体为单克隆抗体。检测相抗体为单克隆抗体，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兔 TGF-beta 3 的含量呈正相关。

试剂盒中内容(96 孔)

编号	组分	规格
EK1103-RB-CAP	预包被抗兔 TGF-beta 3 抗体的 96 孔板 (Pre-coated microplate)	96T
EK1103-RB-ST	重组冻干标准品 (Standard)	2 支
EK1103-RB-DA	生物素标记抗兔 TGF-beta 3(100X) (Biotinylated antibody)	1×100ul
AR1103-RB	亲和素-过氧化物酶复合物（100X）(ABC)	1×100ul
AR1106-1	样品稀释液 (Sample Diluent)	1×30ml
AR1106-2	抗体稀释液 (Antibody Diluent)	1×12ml
AR1106-3	ABC 稀释液 (ABC Diluent)	1×12ml
AR1104	TMB 显色液 (TMB Color Developing Reagent)	1×10ml
AR1105	终止液 (Stop Solution)	1×10ml
AR1106-5	洗涤缓冲液(25X) (Wash Buffer)	1×20ml
	封板膜	4 张
AR1102	活化剂 A、B 液	各 2 支

说明 ：未开启试剂盒可在 2-8℃条件下存放 6 个月或者在-20℃条件下存放 1 年 ，已开启试剂盒请尽快使用，可在 2-8℃存放一个月。

需要而未提供的试剂和器材

1. 酶标仪，配置主波长 450nm。
2. 自动洗板机。
3. 37℃恒温箱。
4. 多种规格单通道移液器和 8 通道移液器，一次性移液器吸头。
5. 不同规格的试管和离心管，加样槽。
6. 漩涡混匀器。
7. 去离子水或蒸馏水。

注意事项

1. 注意产品标签上的有效期，请在有效期之内使用。使用前检查试剂盒中试剂的标签和数量与表格是否一致。
2. 使用前，应将试剂管包括冻干标准品、抗体、ABC 离心数分钟，以便试剂集中到管底。
3 操作过程中避免酶标板孔长时间无液体。干燥会使酶标板上生物成份迅速失活。
4. 为免交叉污染，取不同的样本需要更换吸头。
5. 禁止混用不同指标不同批次的试剂盒内的试剂。
6. 本公司提供的 96 孔酶标板是单条可拆型酶标板，用户可按需求拆取使用，剩余的酶标板放入袋中 4℃冰箱保存，避免污染。所有试剂在分装时会比标签上注明的体积稍多一些，请在使用时量取而非直接倒出。
7. 为保证最佳检测效果，建议相关试剂的工作液即配即用。溶解后的蛋白应在 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。
8. TMB 显色液应是无色透明液体，根据需求取出对应的量进行实验，注意全程避光操作。终止液具有腐蚀性，避免接触皮肤，做好防护。
9. 实验中加样时间、孵育温度和时间、洗板过程都会对实验结果产生影响，请熟练掌握实验流程，严格控制实验条件。
10. 揭开封板膜和覆盖封板膜时应避免用力过大导致液体溅出。
11. 每次检测都应该做标准曲线。而且样本含量应以同次实验标准品曲线方程进行计算。

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，计时浸泡。根据需要，重复此过程数次。

自动洗板机：提前按要求设置好参数，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

1. 收集样本的试管应为一次性的无热原，无内毒素试管。
2. 避免使用溶血或者高血脂的血液样本。
3. 样品收集后应立即检测分析，若不立即检测，请按一次使用量分装-20℃或低于-20℃保存，且避免反复冻融。

血清——收集血液，室温凝固 2 小时后离心 2000-3000×g 10 分钟，收集血清。

尿液——收集样本，2000-3000×g 离心 20 分钟去除沉淀，收集上清。如有沉淀，应再次离心。
血浆——收集血液，EDTA 抗凝血液，30 分钟内离心，2000-3000×g 15 分钟，收集血浆。
细胞培养上清——2000-3000×g 离心 5 分钟去除沉淀，收集上清。
细胞裂解液——对贴壁细胞用预冷的 PBS 轻轻清洗，然后用胰蛋白酶消化，1000×g 离心 5 分钟后收集细胞；悬浮细胞可直接离心收集。收集的细胞用预冷的 PBS 洗涤 3 次。每 100 万个细胞中加入 100-200ul 细胞裂解液(推荐使用 NP-40 裂解液，可以在裂解液中加入蛋白酶抑制剂)，用移液枪吹打均匀，冰上裂解 10 分钟，充分裂解后，10000—14000g 离心 3-5 分钟，取上清。

样品的活化

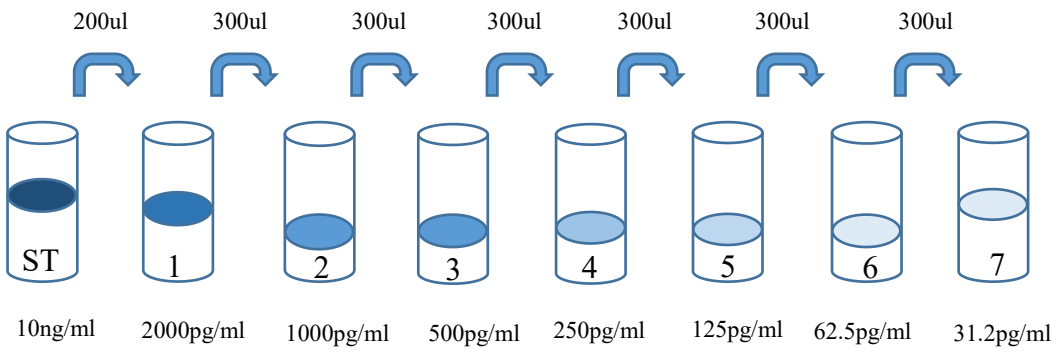
细胞上清等：100ul 样品中加 20ul A 液，10 分钟后再加 20ul B 液。PH 7.0-7.6。
血清：40ul 样品中加 20ul A 液，10 分钟后再加 20ul B 液。PH 7.0-7.6。
重组 TGF-beta 3 不需活化。计算时应考虑活化所至样品稀释。

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 100 倍稀释。297ul 样品稀释液加 3ul 样品。
中——指待测因子在 2-20ng/ml。一般按 10 倍稀释。225ul 样品稀释液加 25ul 样品。
低——指待测因子≤2000pg/ml。按两倍稀释。100ul 样品稀释液加 100ul 样品。
以上方案仅供参考，样品的稀释应有详细记录。

试剂的准备和保存

请提前从冰箱中取出试剂盒平衡至室温，至少需要 30 分钟。
A．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。取 1ml 样品稀释液加入标准品管内，静置 10 分钟以上，然后反复颠倒使用漩涡混匀器以助溶解， 配制成 10,000pg/ml 标准品。再准备 7 支离心管，离心管#1 中加入 800ul 样品稀释液，再加入 200ul 10,000pg/ml 标准品，配制成最高浓度标准品 2000pg/ml，混匀。离心管#2-7 中分别加入 300ul 样品稀释液。从离心管#1 取 300ul 加入到离心管#2 中，混匀后同样取出 300ul ，加入下一只管中。以此类推，直到最后一只样品管。操作如图所示：



B．生物素标记抗兔 TGF-beta 3 抗体工作液：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 生物素标记抗兔 TGF-beta 3 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-过氧化物酶复合物加 ABC 稀释液 99ul 的比例配制工作液。轻轻混匀。

D. 1X 洗涤缓冲液的准备：在使用前 1 小时内准备。

1． 根据每孔需要 3ml 计算总的用量（每孔每次加 350ul 洗液）。使用洗板机洗板应根据实际情况多配制一些洗液。
2． 按 12ml　25×洗液加 288ml 去离子水或蒸馏水的比例配制工作液，混匀。

操作程序

试剂或样品稀释时，**切不可忘记混匀**。

1． 确定本次检测所需的已包被抗体的酶标板孔数目。总数=样品数+9(包括标曲 8 个孔和一个 TMB 空白显色孔)；做双份检测时×2。其余重包装好放入冰箱中。
2． 将梯度稀释的标准品#1-7 每孔 100ul 依次加入一排 7 孔中，1 孔只加 100ul 样品稀释液作为零孔。其他样品同样每孔加 100ul。**TMB 空白孔不加液体**。酶标板加上封板膜，37℃反应 90 分钟。
3． 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**。
4． 将准备好的生物素抗兔 TGF-beta 3 抗体工作液按每孔 100ul 依次加入。**TMB 空白孔不加液体**。酶标板加上封板膜，37℃反应 60 分钟。
5． 1X 洗涤缓冲液洗涤 3 次，每次浸泡 60 秒（每孔洗液至少 300ul）。
6． 将准备好的 ABC 工作液按每孔 100ul 依次加入。**TMB 空白孔不加液体**。酶标板加上封板膜，37℃反应 30 分钟。同时将 TMB 显色液放到 37℃恒温箱中平衡 30 分钟。
7． 1X 洗涤缓冲液洗涤 5 次，每次浸泡 90 秒（每孔洗液至少 300ul）。
8． 按每孔依次加入 90ul TMB 显色液，37℃避光反应 15 分钟。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。

注意：1）TMB 空白显色孔只加 TMB 显色液和终止液。
2）加入 TMB 显色液和终止液步骤建议使用 8 通道移液枪。
3）因不同用户实验室条件差异，最佳显色时间会有所不同，需要根据实际情况延长或缩短显色时间，最长显色时间不超过 30 分钟。

9． 按每孔 100ul 依次加入终止液。此时蓝色立即转成黄色。终止液加入顺序和 TMB 显色液的顺序保持一致。
10． 立即用酶标仪在 450nm 测定 O.D.值。

结果分析

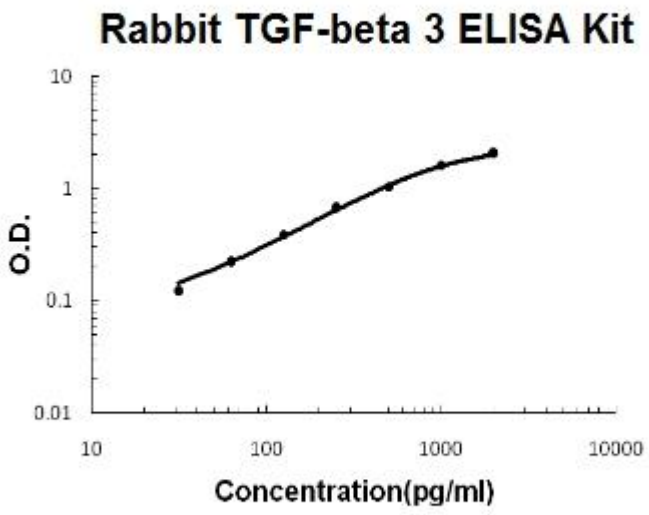
a. 所有的标准品和样品的吸光值减去 TMB 空白显色孔的吸光值。

b. 以标准品浓度作为横坐标，吸光值作为纵坐标，手工绘制或用软件绘图并选取最佳拟合曲线，**四参数拟合法**往往曲线拟合效果较好，但其它方法如线性双对数法也可能获得较好拟合结果，需要根据具体实验数据进行分析。ELISA 绘图软件可以在博士德公司官网技术支持下载。网址：www.boster.com.cn/c/gjhxg 。

c. 根据样品的吸光值在坐标上找出对应的浓度。若标本 OD 值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测，**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. TMB 37℃反应 15 分钟。
5. 加入终止液，读数。

典型数据

浓度(pg/ml)	0	31.2	62.5	125	250	500	1000	2000
O.D.	0.007	0.087	0.143	0.276	0.478	0.783	1.395	2.006