

ELISA试剂盒使用说明书

Human IL-6 ELISA Kit



全国统一热线：400-600-4213
www.biosharp.cn

本试剂盒用于定量检测人血清、血浆或细胞培养上清液等样本中天然和重组IL-6浓度。使用前请仔细阅读说明书并检查试剂组分，如有任何疑问请与合肥兰杰柯科技有限公司联系，公司将为您提供强有力的技术支持。

目录

| | |
|------------------|---|
| 一、产品简介 | 2 |
| 二、检测原理 | 2 |
| 三、试剂盒组分 | 3 |
| 四、储存条件 | 3 |
| 五、注意事项 | 3 |
| 六、其它实验材料 | 4 |
| 七、使用说明 | 4 |
| 7.1、样品收集、处理及保存方法 | 4 |
| 7.2、试剂准备 | 4 |
| 7.3、操作步骤 | 5 |
| 7.4、操作流程圖 | 6 |
| 7.5、操作要点提示 | 6 |
| 7.6、结果判断 | 6 |
| 八、常见问题分析及解决 | 8 |

Human IL-6 (白细胞介素6) ELISA KIT

| 货号 | 名称 | 规格 |
|--------------|-------------------------------|-----|
| BSEH-009-48T | Human IL-6 (白细胞介素6) ELISA KIT | 48T |
| BSEH-009-96T | Human IL-6 (白细胞介素6) ELISA KIT | 96T |

一、产品简介

白细胞介素6(IL-6)是一种由淋巴、非淋巴细胞产生的多功能细胞因子。IL-1、TNF、IFN- β 、PDGF、LPS、Poly I -C、A23187和PMA等对IL-6的产生具有正调节作用。1980年发现成纤维细胞经PolyI-C刺激后能产生一种抑制病毒复制的细胞因子,称为 β 2干扰素(IFN- β)。以后的研究结果未能证实这种因子的直接抗病毒作用,但具有其它多方面的生物学功能,根据实验系统和功能的不同,被命名为杂交瘤/浆细胞瘤生长因子, B细胞分化因子, B细胞刺激因子2, 肝细胞刺激因子等, 1986年统一命名IL-6。

人IL-6的cDNA序列有212个氨基酸残基,含两个潜在的N-糖基化位点。成熟IL-6由疏水N末端28个氨基酸残基信号肽裂解产生,含184氨基酸残基,其中有四个半胱氨酸残基,分子量为21kDa。在氨基酸水平上,人IL-6与小鼠IL-6具有42%的同源性,人的IL-6对小鼠某些细胞有刺激作用。人IL-6基因位于第7号染色体,长约5kb,此细胞因子基因由5个外显子和4个内含子组成。IL-6与G-CSF和IFN- β 有较高同源性,对骨髓造血细胞和髓样白血病细胞的某些作用也有相似之处。

IL-6由多种细胞产生,对免疫应答、急性期反应、造血和神经系统有多方面作用。IL-6的生物学活性主要包括6个方面:调节免疫应答、调节造血系统、诱导急性期蛋白、调节肿瘤生长、调节神经内分泌系统和其它。

1. 调节免疫应答:诱导B细胞分化和产生抗体,诱导T细胞表达IL-2受体和产生IL-2,诱导T细胞活化增殖和分化、激素,保护神经原抵抗毒CTL分化。

2. 调节造血系统:诱导造血干细胞生长,诱导巨核细胞成熟。

3. 诱导急性期蛋白,诱导多种急性期蛋白合成和分泌。加速肝细胞急性期蛋白的合成。

4. 调节肿瘤细胞生长,促进或抑制肿瘤细胞生长。

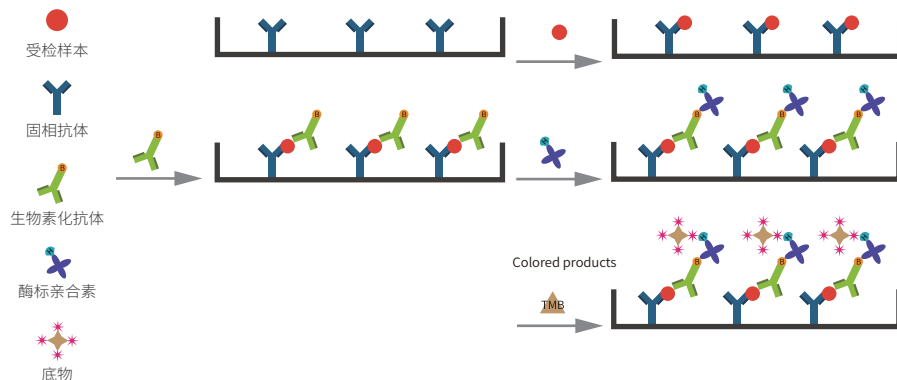
5. 调节神经内分泌系统:诱导神经细胞分化、支持细胞存活,促进神经重建。

6. 其它作用:促进中性粒细胞分化、活化或骨髓细胞,促进角质细胞、肾小球细胞生长,诱导ACTH合成,结合HBV包膜蛋白。

IL-6与临床上多种疾病的发生均有关系。与自身免疫性疾病,肿瘤均有密切的关系。IL-1和TNF- α 对IL-6引起的病理损伤可能有协同作用。应用IL-6治疗由放疗、化疗所致血小板减少症并且作为疫苗佐剂已进入临床试验。

二、检测原理

本实验采用双抗体夹心ELISA。用抗人IL-6单克隆抗体预包被酶标板,加入适度稀释的样本和标准品,其中的IL-6会与其单抗结合,洗去游离成分;加入生物素化的抗人IL-6抗体,抗人IL-6抗体与结合在单抗上的人IL-6结合而形成免疫复合物,洗去游离的成分;加入辣根过氧化物酶标记的亲合素,生物素与亲合素特异性结合,洗去未结合的酶结合物;加入显色剂,若反应孔中有IL-6,辣根过氧化物酶会使无色的显色剂现蓝色;加终止液变黄。在450nm下测OD值;IL-6浓度与OD₄₅₀值之间呈正比,可通过绘制标准曲线计算出标本中IL-6浓度。



三、试剂盒组成

| 组分编号 | 组分 | 96t | 48t | 储存条件 |
|-------------|------------|------|-----|-------|
| BSEH-009-1 | 标准品 | 2支 | 1支 | -20°C |
| BSEH-009-2 | 标准品和标本稀释液 | 1瓶 | 1瓶 | 2-8°C |
| BSEH-009-3 | 浓缩生物素化抗体 | 2支 | 1支 | 2-8°C |
| BSEH-009-4 | 生物素化抗体稀释液 | 1瓶 | 1瓶 | 2-8°C |
| BSEH-009-5 | 浓缩酶结合物(避光) | 2支 | 1支 | 2-8°C |
| BSEH-009-6 | 酶结合物稀释液 | 1瓶 | 1瓶 | 2-8°C |
| BSEH-009-7 | 浓缩洗涤液20× | 1瓶 | 1瓶 | 2-8°C |
| BSEH-009-8 | 显色剂(避光) | 1瓶 | 1瓶 | 2-8°C |
| BSEH-009-9 | 终止液 | 1瓶 | 1瓶 | 2-8°C |
| BSEH-009-10 | 抗体包被板条 | 8×12 | 8×6 | 2-8°C |
| BSEH-009-11 | 封板胶纸 | 4张 | 2张 | 2-8°C |
| | 说明书 | 1份 | 1份 | |

四、储存条件

未启封试剂盒2-8°C保存有效期6个月,启封后建议一个月内使用完毕。产品收到后标准品-20°C保存,其它组分2-8°C保存。

五、注意事项

- 1、试剂盒保存在2-8°C,除复溶后的标准品,其它成分不可冷冻。
- 2、浓缩生物素化抗体、浓缩酶结合物装量极少,运输中颠簸和可能的倒置会使液体沾到管壁或瓶盖。使用前请离心处理以使附着于管壁或瓶盖的液体沉积到管底。
- 3、不同批号试剂不可混用。
- 4、为避免交叉污染请使用一次性吸头。
- 5、终止液和显色剂具腐蚀性,避免皮肤及粘膜直接接触,一旦接触到这些液体,请尽快用大量水冲洗。
- 6、使用干净的塑料容器配制洗涤液,使用前充分混匀试剂盒里的各种成份及样品。
- 7、洗涤酶标板时应充分拍干,不要将吸水纸直接放入酶标反应孔中吸水。
- 8、不要用其它来源的试剂混合或替代该产品的组分,不同批号的试剂盒组份不能混用,请在有效期内使用本产品。
- 9、在试验中标准品和样本检测时建议作双复孔或三复孔,加入试剂的顺序应一致,以保证所有反应孔孵育的时间一样。
- 10、充分混匀对反应结果尤为重要,最好使用微量振荡器(使用最低频率进行振荡)。
- 11、避免操作过程中酶标板干燥,干燥会使酶标板上生物成分迅速失活,影响实验结果。
- 12、适当的稀释样品,使样品值落在标准曲线范围内,根据待测因子含量高、中、低的不同,建议采用1:100、1:10、1:2稀释样品。如果样品OD值高于最高标准,适当增加稀释度并重复检测。
- 13、标准品稀释液,操作人,移液方式,洗涤方法,孵育时间及温度,试剂盒批次的不同均可能会导致结果的差异。
- 14、此法可有效的消除可溶性受体、结合蛋白以及生物样品中的其他因素的干扰。

六、其它实验材料

1. 酶标仪(450nm)
2. 高精度可调移液器及吸头: 0.5-10, 2-20, 20-200, 200-1000 μ L; 一次检测样品较多时, 最好用多通道移液器
3. 自动洗板机或洗瓶
4. 37 $^{\circ}$ C温箱
5. 双蒸水或去离子水
6. 坐标纸
7. 量筒

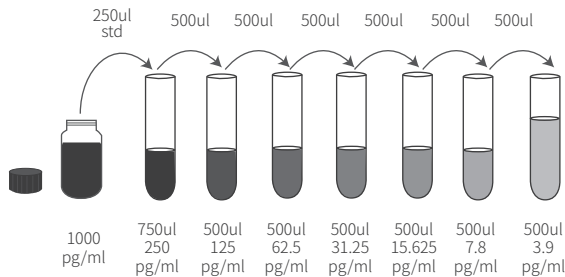
七、使用说明

7.1 样品收集、处理及保存方法

1. 血清: 使用不含热原和内毒素的试管, 收集血液后, 室温凝血30min, 1000 \times g离心10min, 小心分离血清。
 2. 血浆: 用EDTA、柠檬酸盐、肝素作为抗凝剂收集血浆, 收集后30min内以1000 \times g离心15min去除颗粒。
 3. 细胞上清液: 1000 \times g离心10min去除颗粒和聚合物。
 4. 保存: 若样品不立即检测, 请将其按一次用量分装, -20 $^{\circ}$ C \sim -70 $^{\circ}$ C保存, 避免反复冻融。尽量避免使用溶血或高血脂样本。如果血清中含有大量颗粒, 检测前先离心或过滤去除; 室温下解冻, 请勿于37 $^{\circ}$ C或更高的温度加热解冻。
 5. 稀释: 可根据实际情况, 将标本做适当倍数稀释(建议做预实验, 以确定稀释倍数)。
- 注: 正常人血清或血浆样本建议做1:2稀释。

7.2 试剂准备

1. 提前30min从冰箱中取出试剂盒, 平衡至室温。
2. 洗涤缓冲液: 从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶, 这属于正常现象, 加热并轻轻摇晃使结晶完全溶解后再配制。将浓缩洗涤液用双蒸水稀释(1:20)。未用完的放回4 $^{\circ}$ C。
3. 标准品: 加入标准品/标本稀释液1.0mL至冻干标准品中, 待彻底溶解后, 静置15分钟混匀(浓度为1000pg/mL), 然后根据需要进行稀释, 见下图(建议标准曲线使用以下浓度: 250、125、62.5、31.25、15.625、7.8、3.9、0pg/mL)。稀释的标准品不得重复使用, 未用完的标准品应按照一次用量分装后, 将其放在-20 \sim -70 $^{\circ}$ C贮存, 一次性使用, 避免反复冻融。



标准品稀释方法

4. 生物素化抗体工作液: 根据每孔需要100 μ L来计算总的用量, 多配制100-200 μ L。以生物素化抗体稀释液稀释浓缩生物素化抗体(1:100)。最好现用现配。

浓缩生物素化抗体稀释方法

| 所用板条数 | 浓缩生物素化抗 | + | 生物素化抗体稀释液 |
|-------|-------------|---|---------------|
| 12 | 110 μ L | + | 10890 μ L |
| 10 | 90 μ L | + | 8910 μ L |
| 8 | 70 μ L | + | 6930 μ L |
| 6 | 50 μ L | + | 4950 μ L |
| 4 | 33 μ L | + | 3267 μ L |
| 2 | 17 μ L | + | 1683 μ L |
| 1 | 9 μ L | + | 891 μ L |

5. 酶结合物工作液: 以酶结合物稀释液稀释浓缩酶结合物(1:100)。最好现用现配。

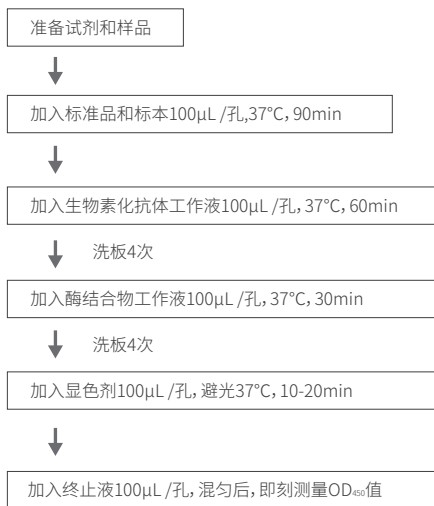
浓缩酶结合物稀释方法

| 所用板条数 | 浓缩酶结合物 | + | 酶结合物稀释液 |
|-------|-------------|---|---------------|
| 12 | 110 μ L | + | 10890 μ L |
| 10 | 90 μ L | + | 8910 μ L |
| 8 | 70 μ L | + | 6930 μ L |
| 6 | 50 μ L | + | 4950 μ L |
| 4 | 33 μ L | + | 3267 μ L |
| 2 | 17 μ L | + | 1683 μ L |
| 1 | 9 μ L | + | 891 μ L |

7.3 操作步骤

1. 按照上述准备工作配制好各种溶液。
2. 根据待测样品数量和标准品的数量决定所需的板条数, 并增加1孔作为空白对照孔。分别将标本和不同浓度标准品(100 μ L/孔)加入相应孔中(零孔只加标准品/样本稀释液), 用封板胶纸封住反应孔, 37 $^{\circ}$ C孵箱孵育90分钟(空白对照孔除外)。
3. 洗板4次: (1)自动洗板机: 要求注入的洗涤液为350 μ L, 注入与吸出间隔15-30秒。(2)手工洗板: 甩尽孔内液体, 每孔加洗涤液350 μ L, 静置30秒后甩尽液体, 在厚透吸水纸上拍干。
4. 加入生物素化抗体工作液(100 μ L/孔)。用封板胶纸封住反应孔, 37 $^{\circ}$ C孵箱孵育60分钟(空白对照孔除外)。
5. 洗板4次。
6. 加入酶结合物工作液(100 μ L/孔)。用封板胶纸封住反应孔, 37 $^{\circ}$ C孵箱孵育30分钟(空白对照孔除外)。
7. 洗板4次。
8. 加入显色剂100 μ L/孔, 避光, 37 $^{\circ}$ C孵箱孵育10-20分钟。
9. 加入终止液100 μ L/孔, 混匀后即刻测量OD₄₅₀值(5分钟内)。

7.4 操作流程图



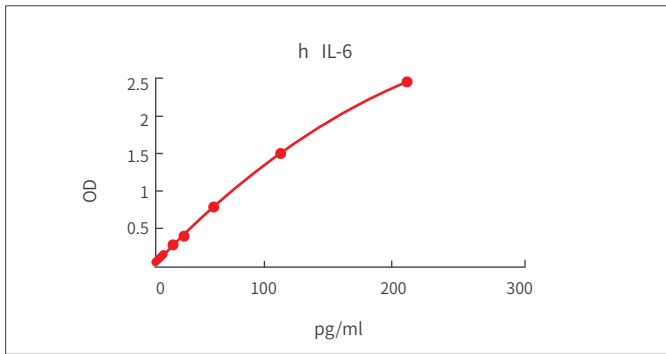
7.5 操作要点提示

1. 配制各种试剂时要充分混匀, 但要避免产生大量泡沫, 以免加样时加入大量的气泡, 产生加样误差。
2. 为避免交叉污染, 在加入不同浓度的标准品、不同样品、不同试剂时谨记及时更换吸头。
3. 为了确保准确的结果, 在每次孵育前均需使用新封板胶纸封住反应孔。
4. 显色剂在添加之前, 应保持无色, 请勿使用已变为蓝色的显色溶液。最佳显色时间对标准曲线很重要, 肉眼可见前3-4孔有梯度蓝色, 后3-4孔差别不明显, 零孔无蓝色出现即可终止。
5. 每次检测均要做标准曲线, 根据样品待测因子的含量, 适当稀释或浓缩样本, 最好做预实验。

7.6 结果判断

1. 每个标准品和标本的OD值应减去空白孔的OD值, 如果做复孔, 求其平均值。
2. 使用计算机软件以吸光度OD值为纵坐标(Y), 相应的IL-6标准品浓度为横坐标(X), 生成相应的标准曲线, 样品的IL-6含量可根据其OD值由标准曲线换算出相应的浓度。
3. 若标本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算标本含量。
4. 参考数据:

| 标准品浓度(pg/mL) | OD值1 | OD值2 | 平均值 | 矫正值 |
|--------------|-------|-------|-------|-------|
| 0 | 0.039 | 0.041 | 0.040 | — |
| 3.9 | 0.126 | 0.129 | 0.127 | 0.087 |
| 7.8 | 0.158 | 0.162 | 0.160 | 0.120 |
| 15.625 | 0.231 | 0.235 | 0.233 | 0.193 |
| 31.25 | 0.373 | 0.376 | 0.374 | 0.334 |
| 62.5 | 0.644 | 0.670 | 0.657 | 0.617 |
| 125 | 1.190 | 1.187 | 1.188 | 1.148 |
| 250 | 2.196 | 2.210 | 2.203 | 2.163 |



注:本图仅供参考,应以同次试验标准品所绘标准曲线为准

结果重复性:

板间,板内变异系数均<10%。

灵敏度:

最低检测人IL-6剂量小于2pg/mL。最低检出量测定方法:20个零标准的平均OD值增加两个标准差,再计算相应的浓度。

特异性:

此试剂盒可检测天然和重组的人IL-6,以50ng/mL平行做特异性试验,均不与下列细胞因子及蛋白反应。

| 重组人细胞因子 | 重组小鼠细胞因子 | 重组大鼠细胞因子 |
|----------------|--------------|----------|
| CD40 Ligand | IL-6 | CNTF |
| CT-1 | IL-10 | G-CSF |
| CTLA-4 | IL-11 | IL-6 |
| G-CSF | IL-12 | OSM |
| sgp130 | IL-12/23 p40 | |
| IL-6 sR | IL-13 | |
| IL-6 sR/sgp130 | | |
| IL-9 | | |
| IL-10 | | |
| IL-12 | | |
| IL-12/23 p40 | | |
| LIF | | |
| LIF R | | |
| OSM | | |
| | | |
| | | |
| | | |

八、常见问题分析及解决

| 问题 | 可能原因 | 解决办法 |
|----------------------------|---------------------------------------|---|
| 无颜色 | 不同试剂盒或不同批号的试剂混合 | 重新检查试剂的标签, 确保所有组分都属于正使用的试剂盒中的。不能混用不同试剂盒或不同批号的试剂。 |
| | 漏加酶 | 检查操作流程, 注意不要漏加 |
| | HRP酶污染了叠氮钠 试剂配制/使用有误 | 使用新配制的试剂, 禁叠氮钠 重做试验, 严格按说明书操作, 每次配制和使用前看清标签 |
| 显色弱 | 超过有效期的产品可能会产生很弱的信号 | 检查产品有效期 |
| | 缩短孵育时间能使实验信号变弱 | 检查孵育时间 |
| | 使用了被污染的试剂 | 检查试剂是否被污染 |
| | 仪器设定不正确, 滤光片不匹配 | 仪器是否设定正确, 滤光片的使用等 |
| | 洗涤操作不规范 | 洗涤不充分, 使用手工洗板常出现 洗瓶洗涤, 每孔应完全充满洗涤缓冲液, 倾出时应迅速 若用洗板机, 应校准并设定足够充满每孔的体积量 检查每孔是否有残留的洗液或每孔加样量的体积是否准确 可在两次洗板之间加30秒的浸泡 |
| 高背景 | 实验中孵育温度和时间不适当 | 确定每一试验步骤的孵育温度和时间是否适当 |
| | 酶过量过多 | 加酶前检查移液器调节量是否准确 检查稀释度, 必要时进行效价测定 |
| 全部板子变成规则的蓝色 | 不充分的洗涤/洗涤步骤被遗漏使没结合的HRP仍有残留 | 最好使用洗板机充分洗涤 检查每孔是否有残留的洗液或加样量是否准确 |
| | 太多的酶结合物 | 检查稀释度, 必要时进行效价测定 |
| 高CV值花板 | 封板膜或试剂容器被重复使用, 导致HRP残留, 使TMB底物产生非特异蓝色 | 使用新封板膜, 每步使用不同的试剂容器 |
| | 操作不慎或洗涤不充分 | 按说明书洗板、加样和显色, 洗板尤为重要 |
| | 出现干板, 没有使用封板膜、封板膜重复使用 | 确定每两步骤间酶标板应保持湿润 使用封板膜封口, 注意每步使用新鲜的封板膜 |
| 标准曲线可得到, 但两点之间区别很差(低或平的曲线) | 移液器不准确, 吸头重复使用 | 检查并校准移液器, 每次取样必须更换吸头 |
| | 酶结合物不足 | 检查稀释度, 必要时进行效价测定 |
| | 检测抗体不足 | 检查稀释度, 必要时进行效价测定 |
| 标准曲线很好, 但没有任何期望的阳性信号 | 板子显色不足 | 延长底物孵育时间 使用推荐品牌的底物溶液 |
| | 标本中无相应的待检测物质 | 使用内参对照 重复实验, 重新考虑实验的相应参数 |
| 标准曲线很好, 但标本的判读值很高 | 标本基质遮盖检测 | 将标本至少做1:2相应的稀释, 或进行系列稀释 |
| 边缘效应 | 标本中含的待检物质水平超过实验范围 | 稀释标本 |
| 漂移 | 工作环境温度不均衡 | 避免将板子在变化温度环境中孵育 |
| | 实验过程中出现间断 | 整个实验应连续操作, 在实验开始前将所有的标准品和标本做适当的准备。 |
| | 试剂没有按说明书平衡至室温 | 在所有试剂加入孔前, 确保它们已平衡至室温, 除非说明书中有另外的要求。 |
| | 是否可更改试剂盒所提供的操作步骤? | 一般厂商为确保最高的灵敏度, 对试剂盒都进行了优化, 为确保每一试剂盒实验的规范性应按说明书操作。 |
| | 是否可混用不同批次试剂盒中的试剂? | 不可以, 绝大多数试剂在每批试剂盒中是特异的, 若有问题可与厂家或代理商联系。 |
| | 是否可增加或减少标本的体积? | 商品化的试剂盒所需加入的标本体积是优化的, 应按说明书操作, 不建议更改所加标本体积。 |
| | 是否可重新确定自己的标准曲线的点? | 可以。说明书上有建议制备标准曲线时标准品的稀释度, 可改变稀释倍数和增加曲线的点, 但是必须在实验范围内, 高于试剂盒中最高标准品的点和低于灵敏度以下的点是无效的。 |

实际加样情况表

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |