M5 Mouse IL-33 ELISA Kit 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 Mouse IL-33 ELISA Kit	48T	MF807-01
M5 Mouse IL-33 ELISA Kit	96T	MF807-02

【储存条件】

4˚C保存。

【产品简介】

白细胞介素 10(IL-33)是一种多效性细胞因子，可以在多种类型细胞中发挥免疫抑制或免疫刺激的作用。1989 年美国 DNAX 研究所 Fiorentino 等发现小鼠 Th2 细胞株 D10.G4.1 产生一种新的细胞因子，能抑制 Th1 细胞株细胞因子 mRNA 的转录，称为细胞因子合成抑制因子(CSIF)，同年命名为 IL-33(1-6)。

小鼠，大鼠和人 IL-33 cDNA 序列均含 178 个氨基酸残基，内含 18 个氨基酸残基的信号肽序列。成熟 IL-33 分子为 160 氨基酸残基，小鼠和人 IL-33 分子中分别含 5 个和 4 个半胱氨酸残基，分子量为 35～40kDa。小鼠和人 IL-33 基因都定位于第 1 号染色体，其基因组包括５个外显子和４个内含子。小鼠和人 IL-33 在 DNA 和氨基酸水平上分别有 81％和 73％的同源性。人 IL-33 可作用于小鼠源性细胞，而小鼠 IL-33 对人的细胞则无交叉反应。

本实验采用双抗体夹心 ELISA。用抗小鼠 IL-33 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-33 会与其单抗结合，洗去游离成分；加入生物素化的抗小鼠 IL-33 抗体，抗小鼠 IL-33 抗体与结合在单抗上的小鼠 IL-33 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-33，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-33 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-33 浓度。

Mei5bio

【产品组份】

货号及规格	MF807-01(48 Tests)	MF804-07(96 Tests)	保存条件
1a 标准品	1 支(冻干)	2 支(冻干)	4˚C
1b 标准品和标本稀释液	1 瓶	1 瓶	4˚C
2a 浓缩生物素化抗体 100×	1 支	2 支	4˚C
2b 生物素化抗体稀释液	1 瓶	1 瓶	4˚C
3a 浓缩酶结合物 100×	1 支	2 支	4˚C(避光)
3b 酶结合物稀释液	1 瓶	1 瓶	4˚C
4 浓缩洗涤液 20×	1 瓶	1 瓶	4˚C
显色剂	1 瓶	1 瓶	4˚C(避光)
终止液	1 瓶	1 瓶	4˚C
抗体包被板条	8×6	8×12	4˚C
封板胶纸	2 张	4 张	4˚C
说明书	1 份	1 份	

【注意事项】

1. 试剂盒使用前请保存在 2-8˚C。除复溶后的标准品，其他成分不可冻结。

2. 浓缩生物素化抗体，浓缩酶结合物体积小，运输中颠簸和可能的倒置，会使液体沾到管壁或瓶盖。因此使用前请用手甩几下或 1000 rpm 离心 1 分钟，以使附着管壁或瓶盖的液体沉积到管底。

3. 从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶,属于正常现象，微加热至 40˚C使结晶完全溶解后再配制洗涤液。

4. 若需要分次使用标准品，在标准品复溶后应按每一次用量分装，将其放在-20 或-70˚C贮存。避免反复冻融。

5. 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。

6. 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。

7. 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，请在有效日期内使用本产品。

8. 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。

9. 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)。

10. 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。

11. 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。

12. 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。

【标本收集】

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×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×g 离心 15min 去除颗粒。

3. 细胞上清液：1000×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℃~-70℃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℃或更高的温度加热解冻。

5. 稀释：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：正常小鼠血清或血浆样本建议做 1:2 稀释。

Mei5bio

【操作步骤】

一、检测前准备工作

1. 请提前 30 分钟从冰箱中取出试剂盒，平衡至室温。

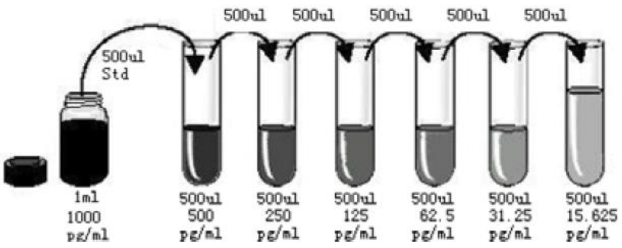
2. 洗涤缓冲液：从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶，这属于正常现象，加热并轻轻摇晃使结晶完全溶解后再配制。将浓缩洗涤液用双蒸水稀释(1:20)。未用完的放回 4℃。

3. 标准品：加入标准品/标本稀释液(1b)1.0ml 至冻干标准品(1a)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，(建议标准曲线使用以下浓度： 1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625、0 pg/ml)。注：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～-70℃贮存，一次性使用，避免反复冻融。

4. 生物素化抗体工作液：根据每孔需要 100μl 来计算总的用量，多配制 100-200μl。以生物素化抗体稀释液(2b)稀释浓缩生物素化抗体(2a)(1:100)。最好现用现配。

5. 酶结合物工作液：以酶结合物稀释液(3b) 稀释浓缩酶结合物(3a)(1:100)。最好现用现配。

标准品稀释方法图例



二．具体操作步骤

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(100μl /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°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 350μl，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 350μl，静置 30 秒后甩尽液体，在厚迭吸水纸上拍干。
4. 加入生物素化抗体工作液(100μl /孔)。用封板胶纸封住反应孔，37°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(100μl /孔)。用封板胶纸封住反应孔，37°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 100μl /孔，避光，37°C孵箱孵育 10-20 分钟。
9. 加入终止液 100μl /孔，混匀后即刻测量 OD450 值(5 分钟内)。

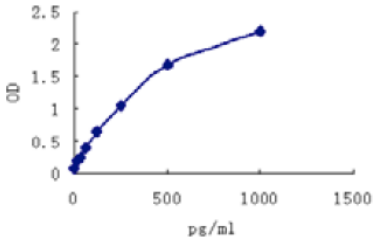
Mei5bio

三．结果判读

1．每个标准品和标本的 OD 值应减去零孔的 OD 值。（若不减零孔值，标准曲线的零孔应相交于 Y 轴）

2．使用计算机软件以标准品浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，生成相应的标准曲线。通过标本的 OD 值可在标准曲线上换算出其浓度。

3．若 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。



【灵敏度，特异性和重复性】

1．灵敏度：最小可测小鼠 IL-33 达 7 pg/ml。

2．特异性：不与 IL-1α, 1β,2,3,4,5,6,7,9,13,LIF,TMIP-2,TNF-a,SCF 等反应。

3．重复性：板内、板间变异系数均<10%。

Mei5bio

【备注】
本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。