

M5 HiPer Mouse IL-6 ELISA KIT 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 HiPer Mouse IL-6 ELISA KIT	48T	MFM-05-T
M5 HiPer Mouse IL-6 ELISA KIT	96T	MFM-05-01

【储存条件】 4℃ 运输，4℃ 保存。

【产品简介】

白介素 6 (IL-6) 是一类多功能的蛋白，在宿主防御，急性期反应，免疫反应，造血功能，神经系统等方面起到重要的作用。根据来源不同，白介素 6 分子量从 21 到 28kDa 不同，但均为单链蛋白。白介素 6 在多种细胞中都有表达，如 T 细胞、巨噬细胞、纤维原细胞、肝细胞、血管内皮细胞等。由于 IL-6 具有不同的活性，所以 IL-6 也被称为干扰素 β 2 (IFN- β 2)、B 细胞刺激因子-2 (BSF-2)、杂交瘤细胞生长因子、肝细胞刺激因子、毒性 T 细胞分化因子、巨噬细胞粒细胞诱导因子 (MGI-2A) 等。白细胞介素 6 在 B-细胞向 Ig 分泌细胞的转化过程起到重要的作用，参与了淋巴细胞和单核细胞的分化，诱导神经细胞在 B-细胞，T-细胞，肝细胞，造血干细胞以及中枢神经系统的分化作用。此外，肌肉运动收缩作用后白细胞介素 6 会被释放到血液中，进而能促进脂肪的分解并改善机体的胰岛素耐受性。

【试剂盒组分】

组分	规格 (96T/48T)
小鼠 IL-6 预包被板	12 条/6 条
样本分析缓冲液	5ml/3ml
标准品稀释液	10ml/5ml
小鼠 IL-6 标准品	4 支/2 支(冻干)
小鼠 IL-6 生物素化抗体	10ml/5ml
亲和素连接的 HRP 酶	10ml/5ml
浓缩洗涤液 20×	30ml/15ml
TMB 底物	10ml/5ml
终止液	5ml/3ml
封板胶纸	3/2 张

【作用原理】

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法检测样本中小鼠 IL-6 的浓度。小鼠 IL-6 捕获抗体已预包被于酶标板上，当加入标本或参考品时，其中的小鼠 IL-6 会与捕获抗体结合，其它游离的成分通过洗涤的过程被除去。当加入生物素化的抗小鼠 IL-6 抗体后，抗小鼠 IL-6 抗体与小鼠 IL-6 接合，形成夹心的免疫复合物，其它游离的成分通过洗涤的过程被除去。随后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，亲合素连接的酶就会与夹心的免疫复合物连接起来；其它游离的成分通过洗涤的过程被除去。最后加入显色剂，若样本中存在 IL-6 将会形成免疫复合物，辣根过氧化物酶会催化无色的显色剂氧化成蓝色物质，在加入终止液后呈黄色。通过酶标仪检测，读其 450nm 处的 OD 值，小鼠 IL-6 浓度与 OD450 值之间呈正比，通过参考品绘制标准曲线，对照未知样本中 OD 值，即可算出标本中 IL-6 浓度。

【样本收集】

1. 标本的收集请按下列流程进行操作；
 - A. 细胞上清标本离心去除悬浮物后即可；
 - B. 血清标本应是自然凝固后，取上清，避免在冰箱中凝固血液；
 - C. 血浆标本，推荐用 EDTA 的方法收集；
 - D. 若待测样本不能及时检测，标本收集后请分装，冻存于 -20℃，避免反复冻融。
2. 血清标本不应添加任何防腐剂或抗凝剂；

3.标本应清澈透明，检测前样本中如有悬浮物应通过离心去除。

4.请勿使用溶血，高血脂或污染的标本检测，否则结果将不准确。

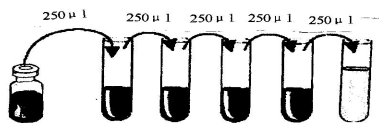
注：小鼠血清或血浆样本请用样本分析缓冲液做倍比稀释后再检测。

【注意事项】

- 1.试剂盒请保存在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 。
- 2.浓缩洗涤液因在低温下可能有结晶，请水浴加热使结晶完全溶解后再配制工作液。
- 3.标准品复溶加样后，剩余部份请丢弃。
- 4.底物请勿接触氧化剂和金属。
- 5.加样时，请及时更换枪头，避免交叉污染。
- 6.严禁混用不同批号的试剂盒组份。
- 7.充分混匀对保证反应结果的准确性很重要，在加液后请轻轻叩击边缘以保证混匀。
- 8.室温反应，请严格控制在 $25\sim 28^{\circ}\text{C}$ 。
- 9.洗涤过程是至关重要的，洗涤不充分会使精确度下降并导致结果误差较大。
- 10.试验中标准品和样本检测时建议作双复孔。
- 11.加样过程中避免气泡的产生。
- 12.血清和血浆标本的检测时，检测抗体的孵育时间应适当延长。

【检验前准备】

- 1.试剂盒自冰箱中取出后应置室温（ $25\sim 28^{\circ}\text{C}$ ）平衡 20 分钟；每次检测后剩余试剂请及时于 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存。
- 2.将浓缩洗涤液用双蒸水或去离子水稀释(1份加19份水)。
- 3.如有5X准品稀释液，请按所需量用双蒸水或去离子水稀释(1份加4水)。
- 4.标准品：按标签复溶体积加入标准品稀释液复溶使IL-6终浓度达到1000pg/ml，室温反应，请严格控制在 $25\sim 28^{\circ}\text{C}$ ，静置10~15分钟后轻轻混悬（建议抽吸几次）待彻底溶解，用标准品稀释液倍比梯度稀释后依次加入检测孔中。（标准曲线取七个点，最高浓度为1000pg/ml,标准品稀释液直接加入作为0浓度.）



【洗涤方法】

自动洗板机或人工洗板：每孔洗涤液为300ul，注入与吸出间隔15-30秒。洗板5次。最后一次洗板完成后将板倒扣着在厚吸水纸上用力拍干。

【自备材料】

- 1.不同规格的加样枪及相应的枪头；
- 2.酶标仪；
- 3.自动洗板机；
- 4.去离子水或双蒸水；

【操作步骤】

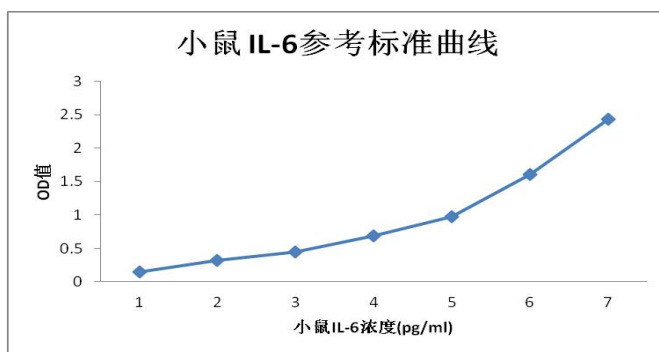
- 1.通过计算并确定一次性实验所需的板条数，取出所需板条放置在框架内，暂时用不到板条请放回铝箔袋密封，保存于4℃。
- 2.建议设置本底校正孔，即空白孔,设置方法为该孔只加TMB显色液和中止液。每次实验均需做标准品对照并画出标准曲线。
3. 分别将样品或不同浓度标准品按照100μl/孔加入相应孔中，用封板膜封住反应孔，室温（25-28℃）孵育120分钟。对于血清血浆样本，先加50ul的样本分析缓冲液，再加50ul样本。如检测超出范围，请先加50ul的样本分析缓冲液，再加用标准品稀释液稀释后的样本50μl检测。请注意记录好样品的稀释倍数，此处加样量50ul相当于已稀释了2倍。
- 4.洗板5次，且最后一次置厚吸水纸上拍干。
- 5.加入生物素化抗体工作液(100ul/孔)。用封板胶纸封住反应孔，室温（25~28℃）孵育60分钟。
- 6.洗板5次，且最后一次置厚吸水纸上拍干。
- 7.加入亲和素连接的HRP酶工作液(100ul/孔)。用封板胶纸封住反应孔，避光室温（25~28℃）孵育20分钟。
- 8.洗板5次，且最后一次置厚吸水纸上拍干。
- 9.加入显色剂TMB100ul/孔，避光室温（25~28℃）孵育20分钟。
- 10.加入终止液50ul/孔,混匀后即刻测量OD450值。

【结果分析】

- 1.复孔的值在20%的差异范围内结果才有效，复孔的值平均后可作为测量值。
- 2.每个标准品或标本的OD值应减去本底校正孔的OD值。
- 3.手工绘制标准曲线。以标准品浓度作横坐标，OD值作纵坐标，以平滑线连接各标准品的坐标点。通过标本的OD值可在标准曲线上查出其浓度。
- 4.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。

浓度pg/ml	典型OD值1	典型OD值2	OD平均值
0	0.138	0.159	0.1485
31.25	0.308	0.324	0.316
62.5	0.434	0.459	0.4465
125	0.696	0.67	0.683
250	1.032	0.914	0.973
500	1.717	1.491	1.604
1000	2.514	2.357	2.4355

典型数值和参考曲线



小鼠IL-6参考标准曲线

注意：本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线计算标本含量。

【灵敏度，重复性和特异性分析】

- 1.灵敏度：多次重复结果表明，最小检出量为12.8pg/ml。
- 2.特异性：与大鼠IL-6,人IL-6没有交叉反应。
- 3.重复性：板内，板间变异系数均<10%.

**【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。