

M5 Mouse IL-6 ELISA Kit 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 Mouse IL-6 ELISA Kit	48T	MF803-01
M5 Mouse IL-6 ELISA Kit	96T	MF803-02

【储存条件】

4°C保存。

【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 Poly I-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 2)。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。

小鼠 IL-6 的 cDNA 序列有 211 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 24 个氨基酸残基信号肽裂解产生,含 187 个氨基酸残基。小鼠、大鼠和人的 IL-6 cDNA 序列克隆均已获得(1-4)。小鼠 IL-6 与人 IL-6 比对, cDNA 序列在氨基酸水平上具有 42%的同源性,人的 IL-6 对小鼠某些细胞有刺激作用(5)。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(6-10)。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。

本实验采用双抗体夹心 ELISA。用抗小鼠 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;加入生物素化的抗小鼠 IL-6 抗体,抗小鼠 IL-6 抗体与结合在单抗上的小鼠 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。

【产品组份】

货号及规格	MF803-01(48 Tests)	MF803-02(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 100x	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 100x	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 20x	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	8x6	8x12	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℃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】

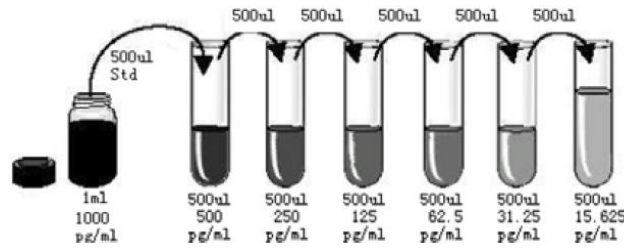
1. 血清：使用不含热原和内毒素的试管，收集血液后，室温凝血 30min，1000×g 离心 10min，小心分离血清。
2. 血浆：用 EDTA、柠檬酸盐、肝素作为抗凝剂收集血浆，收集后 30min 内以 1000×g 离心 15min 去除颗粒。
3. 细胞上清液：1000×g 离心 10min 去除颗粒和聚合物。
4. 保存：若样品不立即检测，请将其按一次用量分装，-20℃~-70℃保存，避免反复冻融。尽量避免使用溶血或高血脂样本。如果血清中含有大量颗粒，检测前先离心或过滤去除；室温下解冻，请勿于 37℃或更高的温度加热解冻。
5. 稀释：根据实际情况，将标本做适当倍数稀释(建议做预实验，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

【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

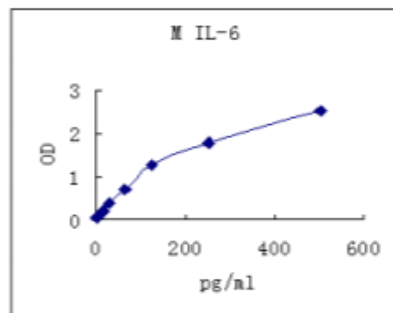


二. 具体操作步骤

- 按照上述准备工作配制好各种溶液。
- 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）。
- 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，在厚迭吸水纸上拍干。
- 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）。
- 洗板 4 次。
- 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）。
- 洗板 4 次。
- 加入显色剂 100 μ l /孔，避光，37 $^{\circ}$ C孵箱孵育 10-20 分钟。
- 加入终止液 100 μ l /孔，混匀后即刻测量 OD450 值(5 分钟内)。

三. 结果判读

- 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）
- 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。
- 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-6 小于 4 pg/ml。
2. 特异性：不与 IL-11, IL-16sR, LIF, OSM, CT-1, gp130 等反应。
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。