

M5 HiPer Mouse IL-18 ELISA KIT 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 HiPer Mouse IL-18 ELISA KIT	48T	MFM-022-T
M5 HiPer Mouse IL-18 ELISA KIT	96T	MFM-022-01

【储存条件】 4°C 运输，4°C 保存。

【产品简介】

白介 18 (IL-18) 是一个 18 kDa 的细胞因子，结构与 IL-1 极其相似，对 T 细胞的活化有重要影响。IL-18 的前体缺少信号肽，前体由 IL-1 β 转换酶 (ICE) 裂解为成熟的 IL-18。

有报道称 IL-18 由下列细胞产生：树突状细胞、活化的巨噬细胞、凯夫勒细胞、角质细胞、肠内皮细胞、格根包尔氏细胞、肾上腺皮质细胞等。其中有报道称人的角质细胞是 IL-18 的主要产生源。

IL-18 对 T 辅助细胞起作用，其效果是与 IL-12 协同强烈刺激 T 辅助细胞产生 IFN- γ 。当然，IL-18 也有许多其它的效用，包括刺激外周血中由单核细胞产生 IFN- γ 和 GM-CSF 水平的升高，刺激 T 细胞产生 Th1 类的细胞因子如 IL-2、IFN- γ 和 GM-CSF 等，提高 Th1 类的细胞表面的 Fas 配体的表达。此外，在治疗肿瘤、感染和自身免疫方面，IL-18 也是一个重要的预后指标。

【试剂盒组分】

组分	规格 (96T/48T)
小鼠 IL-18 预包被板	12 条/6 条
5 \times 标准品稀释液	20ml/10ml
小鼠 IL-18 标准品	2 支/1 支(冻干)*
抗体 HRP 结合物	10ml/5ml
20 \times 浓缩洗涤液	30ml/15ml
TMB 底物	10ml/5ml
中止液	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 IL-18 的浓度。IL-18 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 IL-18 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。当加入辣根过氧化物酶标记的抗小鼠 IL-18 抗体后，抗小鼠 IL-18 抗体与小鼠 IL-18 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。最后加入显色剂，若样本中存在小鼠 IL-18 蛋白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-18 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，即可算出标本中小鼠 IL-18 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 的方法收集若待测样本不能及时检测，
 - D. 标本收集后请分装，冻存于 -20°C，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：样本如需稀释请用标准品稀释液稀释后再检测。

【注意事项】

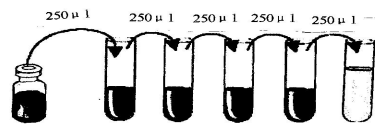
1. 试剂盒请保存在2~8℃。
2. 浓缩洗涤液因在低温下可能有结晶，请水浴加热使结晶完全溶解后再配制工作液。
3. 标准品复溶加样后，剩余部份请丢弃。
4. 底物请勿接触氧化剂和金属。
5. 加样时，请及时更换枪头，避免交叉污染。
6. 严禁混用不同批号的试剂盒组份。
7. 充分混匀对保证反应结果的准确性很重要，在加液后请轻轻叩击边缘以保证混匀。
8. 室温反应，请严格控制在25~28℃。
9. 洗涤过程是至关重要的，洗涤不充分会使精确度下降并导致结果误差较大。
10. 试验中标准品和样本检测时建议作双复孔。
11. 加样过程中避免气泡的产生。

【样本稀释】

1. 血清或血浆样本5~30倍稀释，不同样本含量不一样，检测前需预实验，如无明确范围，可从5倍开始。
2. 细胞上清及尿样本稀释倍数根据预实验确定；

【检验前准备】

1. 试剂盒自冰箱中取出后应置室温（25~28℃）平衡20分钟；每次检测后剩余试剂请及时于2~8℃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. 将5×标准品稀释液用去离子水或双蒸水按1:4稀释成所需的体积；
4. 将检测抗体用检测抗体稀释液按标识提前10分钟配制成工作浓度；
5. 标准品: 按标签复溶体积加入标准品稀释液复溶使IL-18终浓度达到1500pg/ml，室温反应，请严格控制在25~28℃，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1500pg/ml,标准品稀释液直接加入作为0浓度。）下图为标准品稀释示意图。



【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. 分别将稀释好的标本或不同浓度标准品(100ul/孔)加入相应孔中，用封板胶纸封住反应孔，室温（25~28℃）孵育120分钟。
4. 洗板3次（重要提示，一定是三次），且最后一次置厚吸水纸上拍干。
5. 每孔加入HRP抗体结合物工作液(100ul/孔)。用封板胶纸封住反应孔，室温（25~28℃）孵育60分钟。

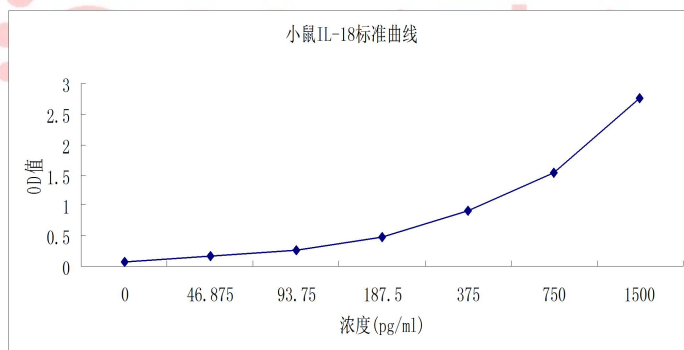
- 6.洗板3次（重要提示，一定是三次），且最后一次置厚吸水纸上拍干。
7. 加入显色剂TMB100ul/孔，避光室温（25~28℃）孵育20分钟。
8. 加入终止液50ul/孔,混匀后即刻测量OD₄₅₀值。

【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	0.076	0.086	0.081
46.875	0.134	0.218	0.176
93.75	0.213	0.339	0.276
187.5	0.412	0.55	0.481
375	0.811	1.015	0.913
750	1.46	1.62	1.54
1500	2.603	2.909	2.756

典型数值和参考曲线



小鼠IL-18参考标准曲线

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 16.8pg/ml。
- 2.特异性：与小鼠的 IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 p70, IL-13, IL-17 及人 IL-18 等没有交叉反应。
- 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。