

## Mouse IL-6 High Sensitivity ELISA Kit

产品编号: HSEK0411

规格: 96T

检测范围: 1.56pg/ml→100pg/ml。

灵敏度: 0.17pg/ml

特异性: 系统和其它细胞因子无交叉反应。

保存: 2-8°C (频繁使用时); -20°C (长时间不用时)。

有效期: 6 个月(4°C); 12 个月 (-20°C)。

用途: 用于体外定量分析小鼠血清、血浆、细胞培养上清。

### 工作原理

Interleukin-6, IL-6, 白介素-6。IL-6 是一种多功能细胞因子, 在体内免疫反应调节、血细胞的增生、防御机制和急性期反应中起中心作用。既可由淋巴细胞产生, 也能由非淋巴细胞合成, 如单核/巨噬细胞, 纤维母细胞, 肝细胞, 角化细胞, 星形细胞, 血管内皮细胞和各种肿瘤细胞。IL-6 的合成受多种细胞因子、核分裂因子和抗原的刺激而增加。IL-6 是一种糖蛋白, 包含 N- 和 O- 连碳水化合物, 分子量 21KD-28KD。其糖蛋白成份并非功能所必须。本试剂盒所用的标准品为重组 IL-6, 有 188 个氨基酸。分子量 21.8KDa。

博士德所提供的 IL-6 ELISA Kit 是典型的夹心法酶联免疫吸附测定试剂盒 (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay, ELISA)。预先包被的抗体为单克隆抗体, 克隆号 MP520F3。检测相抗体为多克隆抗体, 经生物素 (biotin) 标记。样品和生物素标记抗体先后加入酶标板孔反应后, PBS 或 TBS 洗涤。随后加入过氧化物酶标记的亲和素反应; 经过 PBS 或 TBS 的彻底洗涤后用底物 TMB 显色。TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色, 并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的 IL-6 呈正相关。

### 试剂盒中内容(96 孔)

注意: 使用前请检查试剂盒中试剂的标签和数量与表格是否一致

需要而未提供的试剂和器材

内容	规格	数量
预包被抗小鼠 IL-6 抗体的 96 孔板	96T	1 板
重组小鼠 IL-6 冻干标准品	10ng/管	2 管
生物素标记抗小鼠 IL-6(100X)	100ul	1 管
亲和素-过氧化物酶复合物 (ABC) (100X)	100ul	1 管
样品稀释液	30ml	1 瓶
抗体稀释液	12ml	1 瓶
ABC 稀释液	12ml	1 瓶
TMB 显色液	10ml	1 瓶
终止液	10ml	1 瓶
洗涤缓冲液(25X)	20ml	1 瓶
封板膜		4 张

1. 标准规格酶标仪。

Phone: 027-67845390/1/2

Email: boster@boster.com

Web: www.boster.com

2. 自动洗板机。
3. 恒温箱
4. 微孔板恒温振荡器
5. 系列可调节移液器及吸头，一次检测样品较多时，最好用多通道移液器。
6. 干净的试管和 Eppendorf 管。
7. 用去离子水将 25X 洗涤缓冲液稀释 25 倍，成 1X 洗涤缓冲液。

### 注意事项

1. 使用前 TMB 显色液应为无色透明溶液，若发现颜色异常，请及时与厂家联系。
2. 用户在初次使用试剂盒时，应将各种试剂管离心数分钟，以便试剂集中到管底。
3. 要严格避免操作过程中酶标板干燥。干燥会使酶标板上生物成份迅速失活。
4. 为免交叉污染，要避免重复使用手中的吸头和试管。
5. 禁止混用不同批次试剂盒内的试剂。
6. 本公司提供的 96 孔酶标板是单条可拆型酶标板，用户可按需求使用；剩余的酶标板请按保存条件贮存。
7. 揭封板膜和覆盖封板膜时应避免用力过大导致液体溅出。

### 洗板方法

手工洗板方法：吸去（不可触及板壁）或甩掉酶标板内的液体；在实验台上铺垫几层吸水纸，酶标板朝下用力拍几次；将 1X 洗涤缓冲液至少 300ul 注入孔内，浸泡 1-2 分钟。根据需要，重复此过程数次。

自动洗板：如果有自动洗板机，应在熟练使用后再用到正式实验过程中。

### 样品的准备和保存

样品如果不立即分析，应分装后冷冻保存，且避免反复冻融。

血清——用干净试管收集血液，室温凝固 30 分钟，离心 1000×g 15 分钟，收集血清。立即分析或分装后-20°C冷冻保存。

血浆——采用肝素、EDTA 抗凝，抽血后 30 分钟内离心 1000×g 15 分钟。立即分析或分装后-20°C冷冻保存。

细胞培养上清——1000×g 离心 5 分钟去除沉淀，收集上清。

建议健康血清血浆样本两倍稀释检测，100ul 样品稀释液加 100ul 样品。

### 试剂的准备和保存

#### A. IL-6 标准品的稀释和使用。

试剂盒提供 2 管标准品，每管 10ng，每次使用 1 管。

1. 配制 10,000pg/ml 标准品：取 1ml 样品稀释液加入标准品管内，盖好后静置 10 分钟以上，然后颠倒/搓动以助溶解。
2. 配制 100pg/ml 标准品：取 10ul 10,000pg/ml 的标准品加入有 0.99ml 样品稀释液的 Eppendorf 管中，混匀，做上标记。
3. 配制 50pg/ml→1.56pg/ml 标准品：准备 6 只 Eppendorf 管，每管加 0.3ml 样品稀释液，分别标记上 50pg/ml, 25pg/ml, 12.5pg/ml, 6.25pg/ml, 3.13pg/ml, 1.56pg/ml。取 0.3ml 100pg/ml 的标准品加入标记 50pg/ml 的管中，混匀后同样取出 0.3ml，加入下一只管中。余同此类推，

直到最后一只样品管。

**注意:** 已经稀释的标准品 (10,000pg/ml) , 应在 12 小时内使用。-20°C冷冻保存条件下, 2 天内可以使用,但不得反复冻融。

B. 生物素标记抗小鼠 IL-6 抗体工作液: 在使用前 2 小时内准备。

1. 根据每孔需要 100ul 计算总的用量 (实际配制时应多配制 100-200ul) 。
2. 按 1ul 生物素标记抗小鼠 IL-6 加抗体稀释液 99ul 的比例配制工作液。轻轻混匀。

C. 亲和素-过氧化物酶复合物 (ABC) 工作液的准备: 在使用前 1 小时内准备。

1. 根据每孔需要 100ul 计算总的用量 (实配时应多配制 100-200ul) 。
2. 按 1ul 亲和素-过氧化物酶复合物 (ABC) 加 ABC 稀释液 99ul 的比例配制工作液。轻轻混匀。

## 操作程序

TMB 显色液在加入酶标板孔前应预先在 37°C 中平衡至少 30 分钟。试剂或样品稀释时, 切不可忘记混匀。每次检测都应该做标准曲线。用户须估计样品待测因子的含量, 决定适当的稀释倍数。

1. 确定本次检测所需的已包被抗体的酶标板孔数目, 并增加 1 孔作为 TMB 空白显色孔。总数 = 样品数 + 9; 做双份检测时 × 2。其余重包装好放入冰箱中。
2. 将 100pg/ml , 50pg/ml, 25pg/ml, 12.5pg/ml, 6.25pg/ml, 3.13pg/ml, 1.56pg/ml 的标准品各 100ul 依次加入一排 7 孔中, 1 孔只加样品稀释液的作为零孔。对于小鼠血清、血浆、细胞培养上清, 直接加已用样品稀释液稀释的样品 100ul。
3. 酶标板加上封板膜, 室温振荡反应 90 分钟, 速度 500rpm, 振幅 3mm。
4. 反应后用自动洗板机吸去酶标板内的液体; 或甩去酶标板内液体, 再对着吸水纸拍几下。不洗。
5. 将准备好的生物素抗小鼠 IL-6 抗体工作液按每孔 100ul 依次加入 (TMB 空白显色孔除外)。酶标板加上封板膜, 室温振荡反应 60 分钟, 速度 500rpm, 振幅 3mm。
6. 1X 洗涤缓冲液洗涤 3 次, 每次浸泡 1 分钟左右 (每孔洗液至少 300ul)。
7. 将准备好的 ABC 工作液按每孔 100ul 依次加入 (TMB 空白显色孔除外)。酶标板加上封板膜, 室温振荡反应 30 分钟, 速度 500rpm, 振幅 3mm。
8. 1X 洗涤缓冲液洗涤 5 次, 每次浸泡 1-2 分钟左右 (每孔洗液至少 300ul)。
9. 按每孔 90ul 依次加入已在 37°C 平衡 30 分钟的 TMB 显色液, 37°C 避光反应 25-30 分钟 (此步骤不需要振荡)。

**注意:** 显色时间供参考, 因用户实验室条件差异, 最佳显色时间会有所不同。此时肉眼可见标准品的前 3-4 孔有明显的梯度蓝色, 后 3-4 孔差别不明显。

10. 按每孔 100ul 依次加入终止液, 此时蓝色立转黄色。
11. 用酶标仪在 450nm 测定 O.D. 值。

有两种设定空白对照的方案:

- (1) 将 TMB 空白显色孔(只加 TMB 显色液和终止液)设为对照。所有的标准品和样品的吸光值减去 TMB 空白显色孔的吸光值后, 在坐标纸上画出曲线, 以吸光值作为纵坐标, 以浓度作为横坐标。

Phone: 027-67845390/1/2

Email: boster@boster.com

Web: www.boster.com

(2) 将零孔设为对照。所有的标准品和样品的吸光值减去零孔的吸光值后，得到的数据可以直接在坐标纸上画出曲线。

12. 根据样品的吸光值在坐标上找出对应的浓度。用户也可以使用各种应用软件来计算。应记住由于样品稀释了 N 倍，其实际浓度应该  $\times N$ 。

### 操作程序总结：

1. 加样品和标准品，室温振荡反应 90 分钟。不洗。
2. 加生物素标记抗体，室温振荡反应分钟。1X 洗涤缓冲液洗涤 3 次。
3. 加 ABC，室温振荡反应 30 分钟。1X 洗涤缓冲液洗涤 5 次。
4. TMB37°C 反应 25-30 分钟。
5. 加入终止液，读数。

### 典型数据

TMB37°C 反应 15 分钟。

(数据供参考，不同用户最佳显色时间会有所不同)

浓度	0.0pg/ml	1.56pg/ml	3.13pg/ml	6.25pg/ml	12.5pg/ml	25pg/ml	50pg/ml	100pg/ml
O.D.	0.030	0.117	0.172	0.315	0.506	0.939	1.775	2.481