

人白介素 10 酶联免疫试剂盒

Human IL-10 ELISA Kit

用于血清, 血浆, 细胞上清及其他生物体液中

人白介素 10 的检测

货号: A1010A0110

96 tests

仅供科研使用, 勿用于药物、临床检测

检测原理:

本试剂盒采用双抗夹心法。用抗 Human IL-10 抗体包被于酶标板上, 标准品和样本中的 Human IL-10 与单抗结合, 加入生物素化的抗 Human IL-10, 形成免疫复合物连接在板上, 辣根过氧化物酶标记的 streptavidin 与生物素结合, 加入底物工作液显蓝色, 最后加终止液, 在 450nm 处测 OD 值, Human IL-10 浓度与 OD 值成正比, 可通过绘制标准曲线求出标本中 Human IL-10 的浓度。

试剂盒组份 (2-8°C 保存)

1. Human IL-10 酶标板 (coated wells), 12*8wells (单孔可折), 1 plate;
2. Human IL-10 标准品 2 ng (standards), 2 vial;
3. Human IL-10 100×生物素化二抗 (Biotinylated Antibody), 120μL, 1 vial;
4. Human IL-10 150×亲和链霉素辣根过氧化物酶结合物 (Streptavidin HRP Conjugate), 100μL, 1 vial;
5. 稀释液 I (Assay Diluent I), 12 mL, 1 vial;
6. 稀释液 II (Assay Diluent II), 12 mL, 1 vial;
7. 稀释液 III (Assay Diluent III), 12 mL, 1 vial;
8. 20×浓缩洗涤液 (Wash Buffer), 50 mL, 1 vial;
9. 显色液 A (Color Reagent A), 6 mL, 1 vial;
10. 显色液 B (Color Reagent B), 6 mL, 1 vial;
11. 终止液 (Stop Solution), 12 mL, 1 vial;
12. 封板膜, 3 张;

未提供的试剂、仪器和耗材:

1. 单道或多道 (8 道或 12 道) 移液器及移液器枪头: 10-200μL 和 50-1000μL;
2. 多道 (8 道或 12 道) 移液器试剂存放槽;

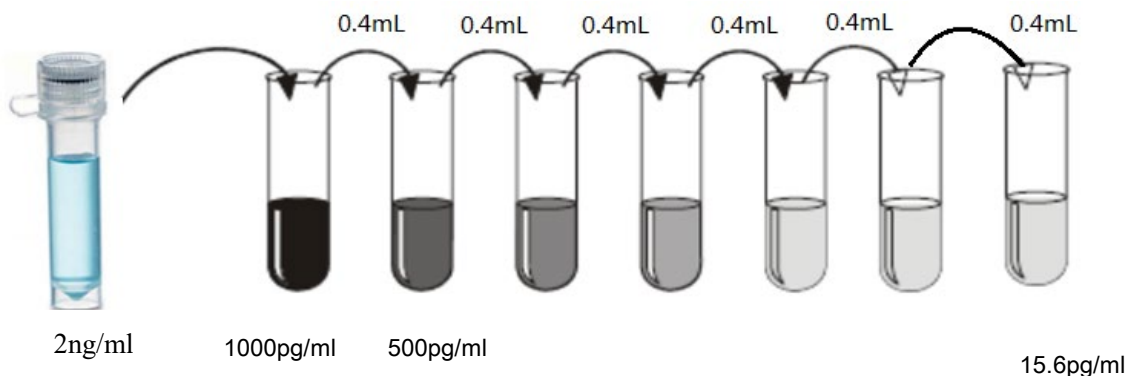
3. EP 管及试剂配置容器 ;
4. 圆柱形量筒 : 100mL , 200mL , 500mL 和 1L ;
5. 可在 450nm 处进行读数的酶标仪 ; 洗瓶或自动洗板机 ;
6. 蒸馏水或去离子水 ; 封板膜或板盖 ; 乳胶手套 ; 吸水纸 ;

注意事项 :

1. 严格按照规定的时间和温度进行温育以保证准确结果。所有试剂都必须在使用前达到室温 20-25°C。使用后应立即冷藏保存试剂。
2. 洗板不正确可以导致不准确的结果。在加入底物前确保尽量吸干孔内液体。温育过程中不要让微孔干燥掉。
3. 消除板底残留的液体和手指印, 否则影响 OD 值。
4. 底物显色液应呈无色或很浅的颜色, 已经变蓝的底物液不能使用。
5. 避免试剂和标本的交叉污染以免造成错误结果。
6. 在储存和温育时避免强光直接照射。
7. 任何反应试剂不能接触漂白溶剂或漂白溶剂所散发出来的强烈气体。任何漂白成分都会破坏试剂盒中反映试剂的生物活性。
8. 标准孔及待测样本均建议做复孔, 每次测定应同时做标准曲线, 请合理安排预实验。
9. 不能使用过期产品。

样本与试剂准备 :

1. **样本** : 本试剂盒可检测血清, 血浆 (EDTA, 肝素抗凝), 细胞培养上清液, 组织匀浆等生物学样本。样本储存要求 2-8°C 保存 48 小时以内, 更长时间需冷冻 (-20°C 或 -80°C) 保存, 避免反复冻融。如样本 Human IL-10 含量过高, 可用稀释液 I 进行稀释。
2. **标准品配制** : 将 2ng 标准品离心后, 加入 1000 μ L 的稀释液 I 配制成浓度为 2ng/mL 的标准品溶液, 轻轻振荡混匀。取 400 μ L 稀释液 I 到空 EP 管中, 加入 400 μ L 浓度为 2ng/mL 的标准品, 混匀, 配成浓度为 1000pg/mL 的标准品溶液 (标准曲线最高点); 再准备六支 EP 管, 分别加入 400 μ L 稀释液 I, 吸取 1000pg/mL 的标准品溶液 400 μ L 加入第一管中, 充分混匀, 从第一管中取 400 μ L 加到第二管中, 充分混匀, 如此反复对半稀释至浓度 15.6pg/mL 的标准品溶液; 另取一空白 EP 管加入足量的稀释液 I, 设为空白对照。



3. **1×Biotinylated Antibody** : 用稀释液 II 按 1:100 倍稀释 100×生物素化二抗。
4. **1×Streptavidin-HRP Conjugate** : 用稀释液 III 按 1:150 倍稀释 150×亲和链霉素辣根过氧化物酶结合物。
5. **显色液配制** : A 液和 B 液做 1 : 1 配制，即配即用，可根据使用量临时配制（使用前 15 分钟内配制），不要配制过多的显色液。
6. **1×洗涤液配制** : 用蒸馏水 1 : 20 倍稀释（示例：1mL 20×浓缩洗涤液加入 19mL 蒸馏水）；

操作步骤：

样本，细胞上清，细胞裂解液，脑脊液，以及其他生物学样本均需要在正式实验前预实验确认稀释倍数；血清样本一般情况下建议按照 50 μ L 上样。

酶标板是 12*8wells 的 lockwell 形式，属于单孔可折形式，可以按照自己的需要每次拆下相应的板条来进行实验；如果第一次使用 biotnt 的这款试剂盒，建议您在进行大批量实验之前先进行预实验；

预实验方式：选用 1 条酶标板，加入标准品 2000pg/ml，8.2pg/ml，0 孔；另外，再选择您待测的两个样本，第一个样本选择三个稀释梯度；第二个样本选择两个稀释梯度来进行预实验；

实验步骤：

1. 加样：加入相对应标准品 100 μ L，加入待测样品 50 μ L、稀释液 I 50ul（样本已经稀释 2 倍回归计算时需乘以稀释倍数 2），封板，充分混匀，室温温育 120 分钟；
2. 洗板：用 1×洗涤液将反应板充分洗涤 3 次，在吸水纸上拍干；
3. 每孔加入已稀释 1× Biotinylated Antibody 100 μ L，封板，室温温育 120 分钟；
4. 洗板：同第二步；
5. 每孔加 1×Streptavidin- HRP 100 μ L，封板，室温温育 20 分钟；
6. 洗板：同第二步；
7. 每孔加入已配制的显色工作液 100 μ L，将反应板置暗处室温 5-15 分钟，每隔一段时间，目测标准品和样本的板孔变为蓝色，酶标仪 620-630nm 进行读数并保存（第一次数

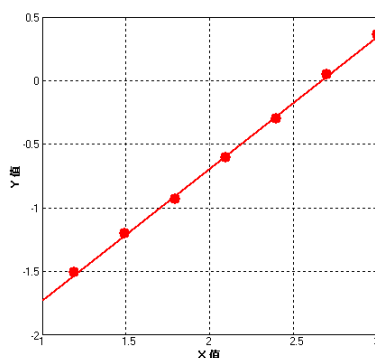
据), 标准品孔的最高点读数 OD 值如果超过 0.8, 请及早终止。如果标准品最高点读数没有超过 0.4, 可以延长室温温育时间为 30min, 再进行下一步终止反应。

8. 每孔加入 50 μ L 终止液, 混匀; 如果颜色呈现绿色或者颜色的变化明显不均匀, 请轻轻叩击板框, 充分混匀。
9. 在 5 分钟内进行酶标仪读数, 设置双波读数 (第二次数据), 酶标仪主波长 450nm, 副波长 620-630nm 检测吸光度。校准后的 OD 值为 450 nm 的测定值减去 620-630 nm 的测定值。仅使用 450 nm 测定会导致 OD 值偏高, 并且准确度降低。
10. 如果酶标仪没有 620-630nm 的波长, 也可以根据酶标仪的情况选择 570-650nm 的波长作为替代。

结果计算与判断:

1. 所有 OD 值都应减除空白值后再计算; 先计算 450-630nm 的数据 (第二次数据);
2. 以标准品 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6, 0pg/mL 为横坐标, 450-630nm 的 OD 值为纵坐标, 画出标准曲线。
3. 根据样本 OD 值在该曲线图上查出相对应 Human IL-10 含量, 如样本有稀释, 请再乘上稀释倍数。如果样本没有进行预稀释, 则稀释倍数为 2。计算出的数值应该乘以 2。
4. 推荐采用双对数方式进行数据拟合。如下是示例数据:

Standard (pg/mL)	O.D. (450 nm-630nm)	Mean	Zero Standard Subtracted (Std.)-(S1)
1000pg/ml	2.336,2.344	2.340	2.280
500pg/ml	1.17,1.174	1.172	1.112
250pg/ml	0.558,0.567	0.563	0.503
125pg/ml	0.301,0.307	0.304	0.244
62.5pg/ml	0.172,0.179	0.176	0.116
31.3pg/ml	0.12,0.123	0.122	0.062
15.63pg/ml	0.086,0.094	0.090	0.030
0pg/ml	0.057,0.062	0.060	0.000



Human IL-10 标准曲线 (pg/mL)

试剂盒数据批内差 (Intra-Assay) :

选取不同浓度的血浆样本各 3 例在同一次验证实验中加样 20 孔，来验证批内差，检测结果如下：

Sample	1	2	3
N	20	20	20
Mean (pg/mL)	34.24	333.62	667.1
SD (pg/mL)	2.26	16.45	21.08
CV (%)	6.61	4.93	3.16

试剂盒数据批间差 (Inter-Assay) :

选取不同浓度的血浆样本各 3 例在 10 次不同的实验中进行检测，来验证批间差，检测结果如下：

Sample	1	2	3
N	10	10	10
Mean (pg/mL)	36.95	333.7	670.12
SD (pg/mL)	3.17	20.29	43.49
CV (%)	8.57	6.08	6.49

试剂盒灵敏度 (Sensitivity) :

本试剂盒检测 Human IL-10 的最低浓度为 5.21pg/mL，验证实验选取两条标准品进行梯度稀释确认 5.21pg/mL 以上浓度的反应孔 OD 值呈正相关线性分布，Human IL-10 浓度在 5.21-15.63pg/ml 之间样本可以被检测到但会有较大偏差，低于 5.21pg/mL 无法被检出。

试剂盒数据回归性 (Recovery) :

选取血清、血浆、细胞上清等不同类型的人样本按低浓度、中浓度、高浓度分组稀释做回归性验证实验，将线性回归后的浓度值与理论浓度值相比较统计结果如下：

样本类型	Average Recovery%	范围%
血清	105	99-111
血浆	102	92-112
细胞上清	102	94-110