

小鼠白介素 6 酶联免疫试剂盒

Mouse IL-6 ELISA Kit

用于血清，血浆，细胞上清及其他生物体液中

小鼠白介素 6 的检测

货号：A1010A0202

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 Mouse IL-6 抗体包被于酶标板上，标准品和样本中的 Mouse IL-6 与单抗结合，加入生物素化的抗 Mouse IL-6，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，Mouse IL-6 浓度与 OD 值成正比，可通过绘制标准曲线求出标本中 Mouse IL-6 的浓度。

试剂盒组份（2-8℃保存）

1. Mouse IL-6 酶标板（coated wells），12*8wells（单孔可折），1 plate；
2. Mouse IL-6 标准品 20 ng（standards），2 vial；
3. Mouse IL-6 100×生物素化二抗（Biotinylated Antibody），120μL，1 vial；
4. Mouse IL-6 80×亲和链霉素辣根过氧化物酶结合物（Streptavidin HRP Conjugate），150μL，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；

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；

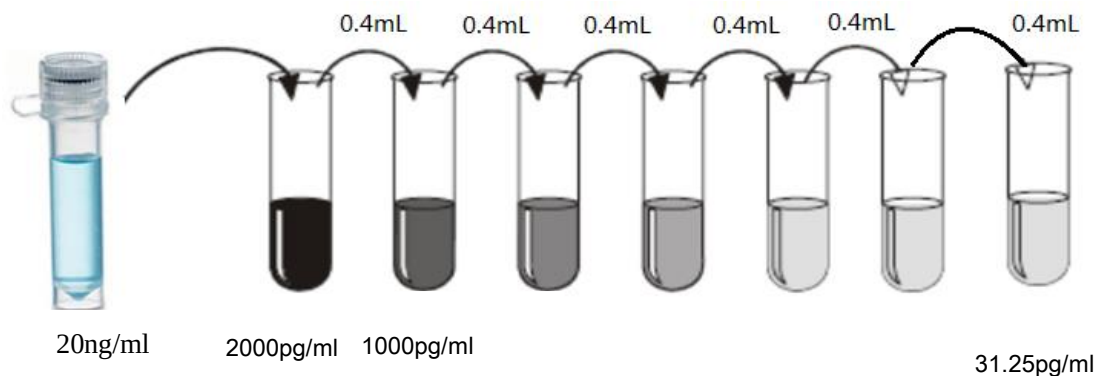
4. 圆柱形量筒：100mL，200mL，500mL 和 1L；
5. 可在 450nm 处进行读数的酶标仪；洗瓶或自动洗板机；
6. 蒸馏水或去离子水；封板膜或板盖；乳胶手套；吸水纸；

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。使用后立即冷藏保存试剂。
2. 洗板不正确会导致不准确的结果。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 Mouse IL-6 含量过高，可用稀释液 I 进行稀释。
2. **标准品配制：**将 20ng 标准品离心后，加入 1000μL 的稀释液 I 配制成浓度为 20ng/mL 的标准品溶液，轻轻振荡混匀。取 900μL 稀释液 I 到空 EP 管中，加入 100μL 浓度为 20ng/mL 的标准品，混匀，配成浓度为 2000pg/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 500μL 稀释液 I，吸取 2000pg/mL 的标准品溶液 500μL 加入第一管中，充分混匀，从第一管中取 500μL 加到第二管中，充分混匀，如此反复对半稀释至浓度 31.25pg/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 1:80 倍稀释 80×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 50μL 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 100μL，加入待测样品 50μL、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 100μL，封板，室温温育 60 分钟；
4. 洗板：同第二步；
5. 每孔加 1×Streptavidin- HRP 100μL，封板，室温温育 30 分钟；
6. 洗板：同第二步；
7. 每孔加入已配制的显色工作液 100μL，将反应板置暗处室温 5-15 分钟，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

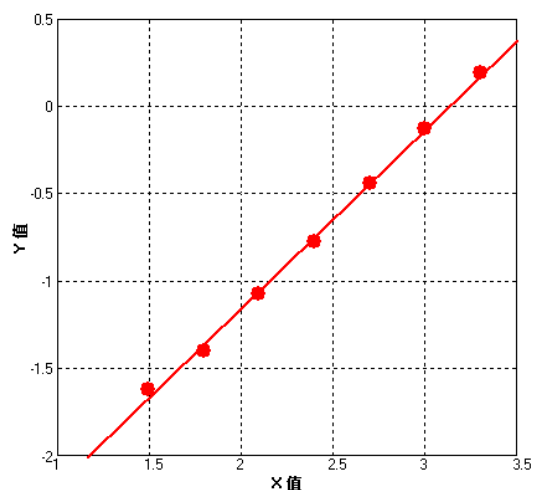
孔的最高点读数 OD 值在 0.7-1.0 之间，可以进行下一步终止反应；

8. 每孔加入 100 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 2000，1000，500，250，125，62.5，31.3，0pg/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 Mouse IL-6 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)
2000pg/ml	1.595,1.598	1.597	1.551
1000pg/ml	0.784,0.79	0.787	0.741
500pg/ml	0.403,0.408	0.406	0.36
250pg/ml	0.212,0.215	0.214	0.168
125pg/ml	0.129,0.133	0.131	0.085
62.5pg/ml	0.083,0.088	0.086	0.04
31.3pg/ml	0.068,0.072	0.07	0.024



Mouse IL-6 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)	28.9	116.4	312.5
Standard Deviation	2.5	5.7	14.8
Coefficient of Variation (%)	7.6	4.9	4.1

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)	27.5	128.4	429.5
Standard Deviation	2.18	7.26	18.9
Coefficient of Variation (%)	7.1	5.2	4.0

试剂盒灵敏度 (Sensitivity) :

本试剂盒检测 Mouse IL-6 的最低浓度为 15.6 pg/mL , 验证实验选取两条标准品进行梯度稀释确认 15.6 pg/mL 以上浓度的反应孔 OD 值呈正相关线性分布 , Mouse IL-6 浓度在 15.6- 31.3 pg/mL 之间样本可以被检测到但会有较大偏差 , 低于 15.6 pg/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	Average Recovery	Average Recovery
血清	100.64%	98.56%	90.24%
血浆	106.52%	94.72%	85.69%
细胞上清	96.41%	91.36%	81.27%

试剂盒数据特异性 (Specificity) :

本 ELISA 试剂盒可以检测自然或重组 Mouse IL-6 蛋白。本试剂盒不与以下蛋白产生交叉反应 : Human IL-6; Human IL-3; Human IL-6R; Human IL-11; Human G-CSF; Human CT-1; Mouse IL-3; Mouse IL-12; Mouse G-CSF; Rat IL-3 β 。试剂盒与 Rat IL-6 有 100% 的交叉反应率。