

产品货号: EKT10106

产品规格: 96T/48T

检测范围: 15.6 pg/mL-1000 pg/mL

灵敏度: 2.28 pg/mL

小鼠白细胞介素-6 (IL-6) 酶联免疫吸附测定试剂盒

Mouse IL-6 (Interleukin-6) ELISA Kit

本试剂盒仅用于科学研究 不用于临床诊断

使用前请仔细阅读产品说明书, 如有问题, 可通过以下方式联系我们:

订购热线: 0571-87000691

技术支持邮箱: service@diagbio.com

公司网址: www.diagbio.com

目 录

一、背景介绍	1
二、检测原理	1
三、产品组成及储藏条件	1
四、产品注意事项	2
五、不同样本的前处理	2
六、实验准备	2
七、操作步骤	5
八、典型数据	6

一、背景简介

小鼠 IL-6 是由 Th2 细胞、巨噬细胞、成纤维细胞等多种细胞分泌的促炎性细胞因子。在免疫应答、造血功能、炎症反应和急性期反应中发挥重要作用。小鼠模型中，该蛋白的异位过表达会导致循环系统中浆细胞过度增殖并引发小鼠死亡；而该蛋白缺失的小鼠则表现出肝脏急性期反应异常、部分免疫功能缺陷、肝脏再生和伤口愈合障碍等多种表型异常。

二、检测原理

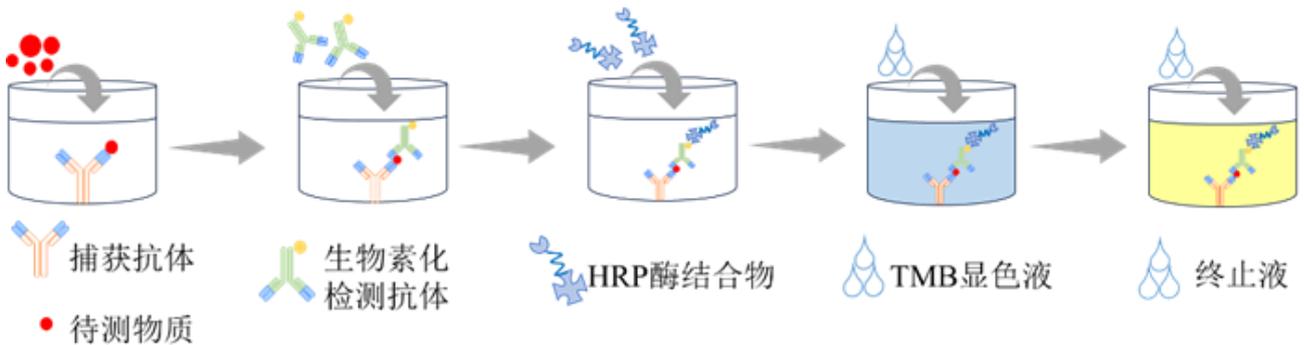


图 1：夹心法模式图

捕获抗体提前包被于 96 孔板上，操作顺序如上图所示。TMB 经 HRP 酶催化后显蓝色，在酸性终止液的作用下转变成黄色，最后用酶标仪读取 OD450nm 处的吸光度值，OD 值的大小与样品（或标准品）中待测物的浓度正相关，以标准品浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，绘制标准曲线，通过标准曲线准确计算样品中待测物的浓度。

三、产品组成及储藏条件

中英文名称	规格（96T）	规格（48T）	储藏条件
ELISA 酶标板	8*12	4*12	2~8 °C
标准品	2 Vial	1 Vial	-20 °C
标准品&样品稀释液	1 Vial: 20 mL	1 Vial: 10 mL	2~8 °C
生物素化检测抗体（100X）	1 Vial: 60 μL	1 Vial: 30 μL	2~8 °C
HRP 酶结合物（100X）	1 Vial: 60 μL	1 Vial: 30 μL	-20 °C
生物素化抗体稀释液	1 Vial: 6 mL	1 Vial: 3 mL	2~8 °C
HRP 酶结合物稀释液	1 Vial: 6 mL	1 Vial: 3 mL	2~8 °C
浓缩洗液（20X）	1 Vial: 20 mL	1 Vial: 10 mL	2~8 °C
TMB 显色液	1 Vial: 12 mL	1 Vial: 6 mL	2~8 °C
终止液	1 Vial: 12 mL	1 Vial: 6 mL	2~8 °C
封板膜	6 张	6 张	2~8 °C

试剂盒不包括以下材料，请自备

- 1) 酶标仪（450 nm 波长滤光片）、摇床。
- 2) 高精度移液枪、离心管、一次性枪头（10 μL , 100 μL , 200 μL , 300 μL , 1000 μL ）、加样槽、吸水纸。
- 3) 双蒸水或去离子水。

四、产品注意事项

- 1) 实验过程中要做好充足地保护措施（如穿白大褂，佩戴护目镜等）；
- 2) 请勿混用其他批号或其他来源的试剂，过期试剂请勿使用；
- 3) 标准品冻干粉、生物素化检测抗体、HRP 酶结合物含量较少，使用前应短暂离心，且标准品冻干粉在复溶后应尽快使用；
- 4) 建议标准品和样品设置复孔，操作过程中保证试剂加样顺序一致，且每次实验均需重新绘制标准曲线；
- 5) 避免皮肤接触显色液和终止液，终止液加入地顺序要完全和显色液加入地顺序一致；
- 6) 正式实验前应进行预实验，若样品的浓度高于标准品的最高浓度，应对样品进行适当地稀释。

五、不同样本的前处理

- 1) 细胞培养上清：将细胞培养上清转移到无菌的离心管内，离心（3000 r/min, 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ ）取上清液待测。
- 2) 血清样本：新鲜收集的全血样本在室温下静置 2 h 或 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 过夜，离心（3000 r/min, 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ ）取上清液待测。
- 3) 血浆样本：将新鲜收集的全血样本加入含抗凝剂（EDTA/柠檬酸/肝素）的离心管内，混匀，离心（3000 r/min, 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ ）取上清待测。
- 4) 组织匀浆：用预冷的 PBS 缓冲液（0.01 M, pH7.4）清洗组织，称重后剪碎，加入研磨缓冲液（一般为 PBS，推荐每 1 g 动物组织加入 9 mL PBS，具体比例可根据实际实验需求进行调整），在冰浴条件下进行研磨，得到的组织匀浆可通过超声破碎或反复冻融进一步处理。将制备好的匀浆液离心（5000 r/min, 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ ）后取上清液待测。

六、实验准备

1) 试剂回温

实验前半个小时左右，将保存在 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 的试剂盒拿出平衡至室温（**试剂盒内部分产品保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 同样需要平衡至室温后使用**）。如果试剂盒需要多次使用，仅取出本次实验所需的酶标板和试剂，剩余的酶标板和试剂按照规定的条件贮存。

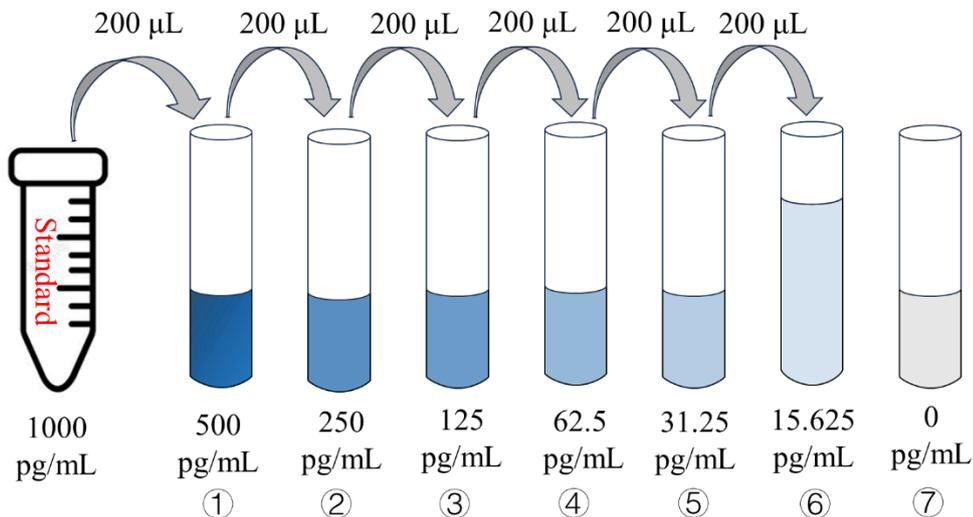
2) 洗液 (1X)

用双蒸水或去离子水按照 1: 19 的比例稀释 **20 X 浓缩洗液**。从冰箱内取出的浓缩洗液若出现结晶属于正常现象, 不影响后续实验结果, 可用 40 °C 的水浴微微加热使结晶完全溶解后配制洗液。

3) 标准品梯度稀释过程

开盖前对**标准品冻干粉**进行简短离心, 加入 1 mL **标准品&样品稀释液**后静置 3 min 左右, 用高精度移液枪缓慢吹打或使用低速涡旋仪使其充分溶解。建议标准品的浓度梯度设置为 1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625、0 pg/mL。

标准品倍比稀释步骤: 取 7 支离心管标记好顺序, 每管中加入 200 μ L **标准品&样品稀释液**, 从原液 (1000 pg/mL) 中取出 200 μ L 加入第一支试管后充分混匀, 再从第一支试管取出 200 μ L 加入到第二支试管, 以此类推, 第七支试管为 200 μ L **标准品&样品稀释液**, 具体操作图示如下:



4) 生物素化检测抗体 (1X)

实验前计算好生物素化检测抗体工作液的用量 (50 μ L/孔), 实际配制时应多配制 100-200 μ L。使用前对**生物素化检测抗体 (100X)**进行简短离心, 用**生物素化抗体稀释液**进行稀释 (例: 1 μ L100X 生物素化检测抗体+99 μ L 生物素化抗体稀释液), 注意现配现用。

5) HRP 酶结合物 (1X)

实验前计算好 HRP 酶结合物工作液的用量 (50 μ L/孔), 实际配制时应多配制 100-200 μ L。使用前对 **HRP 酶结合物 (100X)**进行简短离心, 用 **HRP 酶结合物稀释液**进行稀释 (例: 1 μ L100X HRP 酶结合物+99 μ L HRP 酶结合物稀释液), 注意现配现用。

6) 样品稀释

如果待测样品需要进行稀释, 请用试剂盒提供的**标准品&样品稀释液**稀释血清/血浆/组织样本, 用细胞培养基稀释细胞培养上清。

七、操作步骤

1) 设定标准孔、样品孔、空白孔。标准孔加入 50 μL 倍比稀释的标准品溶液，空白孔加入 50 μL 标准品&样品稀释液，其余样品孔加入 50 μL 处理好的样品溶液，覆膜（吸附上按压几下），摇床（60 r/min）上室温孵育 2 h；

2) 甩干孔内液体，在洁净的吸水纸上拍干，每孔加入 275 μL 1X 洗液，浸泡 3 min 后甩干孔内洗液，拍干，此步骤重复三次；

3) 每孔加入 50 μL 稀释好的生物素化检测抗体工作液，覆膜，摇床（60 r/min）上室温孵育 1 h；

4) 甩干孔内液体，洗板 3 次，同步骤 2；

5) 每孔加入 50 μL 稀释好的 HRP 酶结合物工作液，覆膜，摇床（60 r/min）上室温孵育 1 h；

6) 甩干孔内液体，洗板 3 次，同步骤 2；

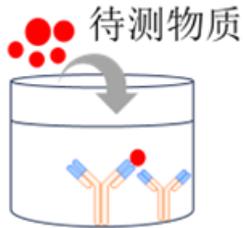
7) 每孔加入 100 μL TMB 显色液，常温下避光反应 5~15 min。注：具体反应时间可根据实际实验现象调整。

8) 每孔加入 100 μL 终止液。注：终止液加入地顺序要和 TMB 显色液加入地顺序一致，加入后轻微震荡酶标板，确保溶液混合均匀。

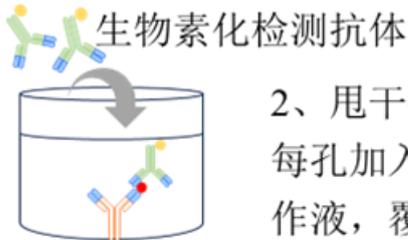
9) 立即用酶标仪在 450 nm 波长测量各孔的光密度(OD 值)。

10) 数据分析：每个标准品或样品的 OD 值减去空白孔的 OD 值，取平均值，以标准品的浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，使用 Origin、ELISACalc 等软件进行四参数拟合，根据拟合出的标准曲线计算出样本浓度（若样本进行稀释处理，还需乘以稀释倍数）。

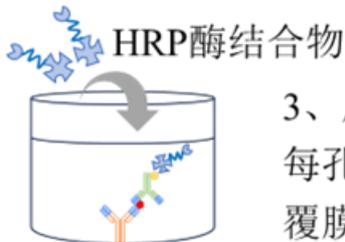
操作流程图



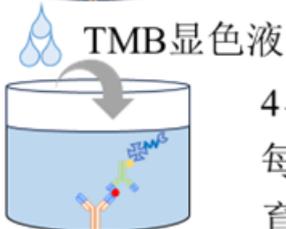
1、向96孔板内加入50 μL 标准品、样品及标准品&样品稀释液，覆膜，摇床（60 r/min）上室温孵育2 h。



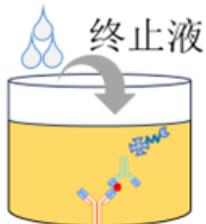
2、甩干孔内液体，拍干，用1X洗液洗板三次。每孔加入50 μL 稀释好的生物素化检测抗体工作液，覆膜，摇床（60 r/min）上室温孵育1 h。



3、甩干孔内液体，拍干，用1X洗液洗板三次。每孔加入50 μL 稀释好的HRP酶结合物工作液，覆膜，摇床（60 r/min）上室温孵育1 h。



4、甩干孔内液体，拍干，用1X洗液洗板三次。每孔加入100 μL TMB显色液，室温下避光孵育5~15 min。



5、每孔加入100 μL TMB终止液，轻轻震荡混匀，用酶标仪在450 nm 波长测量各孔的OD值。

八、典型数据

标准曲线范例：以下数据和曲线仅供参考，实验人员每次实验均需建立标准曲线

