

人白介素 6 酶联免疫试剂盒

Human IL-6 ELISA Kit

用于血清，血浆，细胞上清及其他生物体液中

人白介素 6 的检测

货号：A1010A0102

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

试剂盒组份（2-8℃保存）

1. Human IL-6 酶标板（coated wells），12*8wells（单孔可折），1 plate；
2. Human IL-6 标准品 20 ng（standards），2 vial；
3. Human IL-6 400×生物素化二抗（Biotinylated Antibody），30μL，1 vial；
4. Human IL-6 120×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；

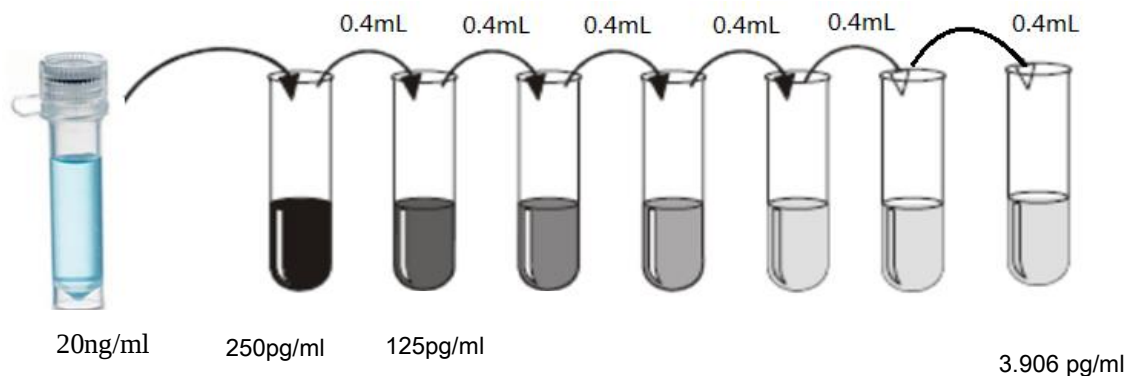
4. 圆柱形量筒：100mL，200mL，500mL 和 1L；
5. 可在 450nm 处进行读数的酶标仪；洗瓶或自动洗板机；
6. 蒸馏水或去离子水；封板膜或板盖；乳胶手套；吸水纸；

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℃。使用后立即冷藏保存试剂。
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℃保存 48 小时以内，更长时间需冷冻（-20℃或-80℃）保存，避免反复冻融。如样本 Human 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 790μL 稀释液 I 到空 EP 管中，加入 10μL 浓度为 20ng/mL 的标准品，混匀，配成浓度为 250pg/mL 的标准品溶液（作为标准品最高点）；再吸取再准备六支 EP 管，分别加入 400μL 稀释液 I，吸取 250pg/mL 的标准品溶液 400μL 加入第一管中，充分混匀，从第一管中取 400μL 加到第二管中，充分混匀，如此反复对半稀释至浓度 3.91pg/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** :使用前先混匀,再离心;吸取相应的量,用稀释液 II 按 1:400 倍稀释 400×生物素化二抗。举例:如果使用一条酶标板,可以混匀,离心,吸取 2.5ul 400×生物素化二抗,稀释到 1ml;
4. **1×Streptavidin-HRP Conjugate** :使用前先混匀,再离心;吸取相应的量,用稀释液 III 按 1:120 倍稀释 120×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:

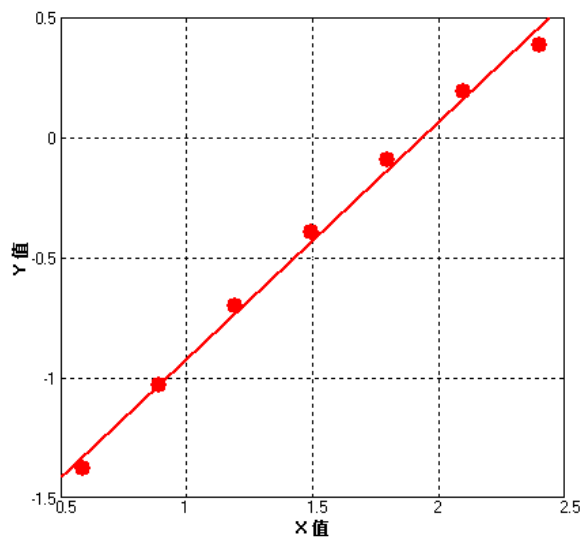
1. 加样:加入相对应标准品 100μL,加入待测样品 50μL、稀释液 I 50ul(样本已经稀释 2 倍回归计算时需乘以稀释倍数 2),封板,充分混匀,室温温育 120 分钟;
2. 洗板:用 1×洗涤液将反应板充分洗涤 3 次,在吸水纸上拍干;
3. 每孔加入已稀释 1× Biotinylated Antibody 100μL,封板,室温温育 60 分钟;
4. 洗板:同第二步;
5. 每孔加 1×Streptavidin- HRP 100μL,封板,室温温育 30 分钟;
6. 洗板:同第二步;

7. 每孔加入已配制的显色工作液 100 μ L，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 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.813, 3.906, 0 pg/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-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 Subtracted(Std.)-(S1)	Standard
250pg/ml	2.482,2.49	2.486	2.414	
125pg/ml	1.609,1.616	1.613	1.541	
62.5pg/ml	0.876,0.886	0.881	0.809	
31.25pg/ml	0.471,0.477	0.474	0.402	
15.625pg/ml	0.269,0.274	0.272	0.200	
7.813pg/ml	0.163,0.166	0.165	0.093	
3.906pg/ml	0.112,0.116	0.114	0.042	



Human 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)	8.99	83.7	167.56
Standard Deviation(pg/ml)	0.51	4.47	5.61
Coefficient of Variation (%)	5.66	5.34	3.35

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)	10.46	83.69	169.89
Standard Deviation(pg/ml)	0.8	5.55	11.42
Coefficient of Variation (%)	7.67	6.63	6.72

试剂盒灵敏度 (Sensitivity) :

本试剂盒检测 Human IL-6 的最低浓度为 1.3pg/mL，验证实验选取两条标准品进行梯度稀释确认 1.3pg/mL 以上浓度的反应孔 OD 值呈正相关线性分布，Human IL-6 浓度在 1.3-3.906pg/ml 之间样本可以被检测到但会有较大偏差，低于 1.3pg/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	107	106-108
血浆	98	93-103
细胞上清	101	94-108

试剂盒数据特异性 (Specificity) :

本 ELISA 试剂盒可以检测自然或重组 Human IL-6 蛋白。本试剂盒不与以下蛋白产生交叉反应：Rat IL-6, Oncostatin M； Mouse: IL-6; IL-11, IL-12; G-CSF; CT-1, CNTF； Human: IL-6R alpha; IL-11; IL-12; CT-1; G-CSF; Leptin; CNTF, Oncostatin M, LIF。