# Mouse IL-6 ELISA Kit

# 小鼠白介素-6 ELISA 试剂盒

**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℃（频繁使用时）；-20℃（长时间不用时）。

**有效期：** 6 个月(4℃)；12 个月（-20℃）。

**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)

| 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 |

***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

1. 标准规格酶标仪。
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 Eppendof 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℃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℃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℃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℃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℃平衡 30 分钟的 TMB 显色液，37℃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。

（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×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℃反应 25-30 分钟。
5. 加入终止液，读数。

## 典型数据

TMB37℃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 |