

# Human IL-6R/CD126 ELISA 试剂盒说明书

Catalog #: DKW12-1126

## 产品描述:

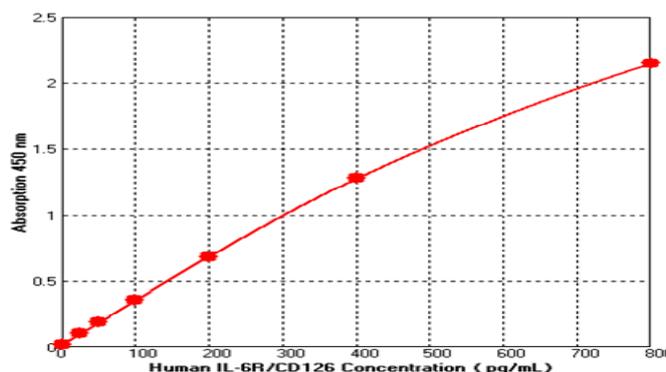
人 IL-6R/CD126 ELISA 试剂盒是通过酶联免疫吸附技术, 体外定量检测人血清、血浆、缓冲液或细胞培养液中的人 IL-6R/CD126。本试剂盒专用于科研, 而非用于诊断。使用前请仔细阅读说明书并检查试剂盒组分, 若有任何疑问请与深圳市达科为生物工程有限公司联系,

E-mail: RD@dakewe.com.

检测范围: 800-25 pg/mL

灵敏度: 10 pg/mL

重复性: 板内、板间变异系数均 < 10%。



注意: 本图仅供参考, 应以同次实验标准品所绘标准曲线来计算标本含量。

## 试剂盒组分:

组分	规格	配制
Cytokine standard	2/1 瓶*	干粉状, 按瓶上说明稀释
Biotinylated antibody	2/1 管*	1 : 50 用 Dilution buffer R(1×)稀释
Streptavidin-HRP	2/1 管*	1: 100 用 Dilution buffer R(1×)稀释
Dilution buffer R(1×)	3/2 瓶*	即用型
Washing buffer (50×)	1 瓶	1 : 50 用蒸馏水稀释
TMB	1 瓶	即用型
Stop solution	1 瓶	即用型
Precoated ELISA plate	8×12 或 8×6*	即用型
封板膜	2/1 张*	即用型
说明书	1 份	

\*: 96 /48 Tests

## 自备物品:

1. 酶标仪 (建议参考仪器使用说明提前预热)
2. 微量加液器及吸头: P10, P50, P100, P200, P1000
3. 蒸馏水或去离子水, 全新滤纸
4. 旋涡振荡器和磁力搅拌器

## 注意事项:

1. 试剂应按标签说明储存, 使用前 **室温平衡** 20-30 分钟。实验前室温平衡对 Washing buffer(50×)、Dilution buffer R(1×)、Precoated ELISA plate 和 TMB 有重要意义。
2. 冻干标准品冰上操作, 按瓶上说明溶解干粉, **充分混匀**, 按照一次使用量分装, -20℃ 贮存, 避免反复冻融。
3. 预包被板条使用前, 请平衡至室温后再打开外包装袋, 实验中不用的板条应立即放回包装中, **密闭封口**, 4℃ 可保存 1 个月。其余不用试剂应包装好或盖好。
4. Washing buffer(50×)在 4℃ 保存可能有 **结晶析出**, 务必使结晶完全溶解后 (如加热、平衡温度后混匀等) 再配制成 1×Washing buffer 工作液。
5. Biotinylated antibody 和 Streptavidin-HRP 体积小, 使用前请 **高速短暂离心** 管子, 以使管壁或管盖的液体沉积到管底。
6. 实验操作中请使用一次性的吸头, 避免交叉污染。
7. 使用前检查试剂盒内各种试剂: 试剂稀释、加样和终止反应充分混匀或者摇匀对实验结果尤为重要, 最好使用低速频率振荡器或者反应过程中每 15 分钟手工摇匀一次。
8. 实验板孔加入试剂的顺序应一致, 以保证所有反应孔的孵育时间一致。

9. 使用洁净的塑料容器盛装洗涤液。
10. 洗涤过程中反应孔中残留的洗涤液应在**滤纸**上充分拍干，直至滤纸上看不到水印。勿将滤纸放入反应孔中吸水。
11. TMB 对光敏感，避免长时间暴露于光下，避免与金属接触影响结果。**有毒，避免与皮肤接触!**准备使用的 TMB 若变为蓝色，表明 TMB 已经污染，请丢弃。请在终止反应后 10 分钟内读取 OD 值。
12. 请严格按照说明书标明的时间和温度进行孵育。冬季室内温度偏低，请使用**恒温箱或培养箱孵育**为好。
13. 试剂盒在保质期内使用，且不同批号试剂不要混用。800 pg/mL 以上的结果为非线性的，根据此标准曲线无法得到精确的结果。大于 800 pg/mL Human IL-6R/CD126 的样品应以标准稀释缓冲液稀释后重做。在结果分析时，结合考虑相应的稀释度。
14. 特异性：不与人其它细胞因子反应。

### 检测前准备：

1. **Cytokine standard**: 外观为冻干粉。先按标签说明将冻干粉溶解，再用 **Dilution buffer R (1×)** 进行倍比稀释，稀释前将标准品轻轻振荡 5 分钟。
  - \* **建议使用标准品浓度梯度为**: 800 pg/mL、400 pg/mL、200 pg/mL、100 pg/mL、50 pg/mL、25 pg/mL。标准品的倍比稀释最好在进口的或者硅化的 EP 管中完成，减少非特异性吸附。在实验孔内进行倍比稀释时，注意操作规范，枪头勿刮划预包被板的孔底。母液若有剩余请按照一次用量分装，-20℃ 保存。
2. **Biotinylated antibody**: 1 : 50 用 Dilution buffer(1×)稀释，混匀制成 **Biotinylated antibody 工作液**。
3. **Streptavidin-HRP** : 1 : 100 用 Dilution buffer(1×)稀释，混匀制成 **Streptavidin-HRP 工作液**。
4. **Washing buffer(50×)**: 1 : 50 用蒸馏水稀释。
5. 即用型溶液
  - **Dilution buffer R (1×)** : 用于稀释 **Cytokine standard**、**样本**、**Biotinylated antibody** 和 **Streptavidin-HRP**。
  - **TMB**
  - **Stop solution**

### 操作过程：

1. 使用前，将所有试剂充分混匀，避免产生泡沫。
2. 根据实验孔（空白和标准品）数量，确定所需的板条数目。样品（含标准品）和空白都应做复孔。
3. **加样**: 100 μL/well 加入稀释后的 Cytokine standard 至标准品孔，100 μL/well 加入样品至样品孔，100 μL/well 加入 Dilution buffer R (1×) 至空白对照孔。
4. **加检测抗体**: 50 μL/well 加入 Biotinylated antibody 工作液。盖上封板膜，室温（18-25℃）孵育 1 小时。
5. **洗板**: 扣去孔内液体，300 μL/well 加入 1×washing buffer 工作液；停留 1 分钟后弃去孔内液体。重复 3 次，最后一次在滤纸上扣干。
6. **加酶**: 100 μL/well 加入 Streptavidin-HRP 工作液。盖上封板膜，室温（18-25℃）孵育 30 分钟。
7. **洗板**: 重复步骤 5。
8. **显色**: 100 μL/well 加入 TMB，室温避光孵育 5-30 分钟。根据孔内颜色的深浅（深蓝色）来判定终止反应。通常显色 10-20 分钟可以达到很好的效果。
9. **终止反应**: 迅速 100 μL/well 加入 Stop solution 终止反应。
10. **读板**: 终止后 10 分钟内，用检测波长（measurement wavelength）450 nm 读值。若用双波长即检测波长（measurement wavelength）450 nm、参考波长或校正波长（reference wavelength）610-630 nm 同时读板，测量结果会更准确。

### 结果分析：

1. 推荐拟合曲线坐标对数或自然数，拟合方程常见为直线、二次方程及四参数方程，通过各种应用软件拟合选取最佳标准曲线，根据样本 OD 值查找相应浓度。
2. 稀释的样本计算浓度时应乘以稀释倍数。

## 操作步骤一览表

加**样本**或配好的 **Cytokine standard**，设置对照，**100  $\mu$ L/well**

无需孵育，直接进行下一步操作

加 **Biotinylated antibody** 工作液，**50  $\mu$ L/well**

室温孵育 1 小时；洗板 3 次

加 **Streptavidin-HRP** 工作液，**100  $\mu$ L/well**

室温孵育 30 分钟；洗板 3 次

加 **TMB** 显色液，**100  $\mu$ L/well**

室温避光 5-30 分钟

加 **Stop solution** **100  $\mu$ L/well**，终止反应

10 分钟内读板

在  $\lambda=450 \text{ nm}$  处读取吸光值

## 参考文献:

1. Yamasaki et al.(1988) Science 241:825
2. Baumann et al.(1990) J Biol.Chem,265:19853
3. Hibi et al.(1990) Cell 63:1149
4. Schooltink et al.(1991) Eur J .Biochem 277:659

附:

## ELISA 测定中可能出现的问题及解决方法

问 题	可能的原因	解决方法
1. 非常弱的结果	(1) 温育的时间或温度不够; (2) 显色反应时间太短; (3) 配制缓冲液的蒸馏水有问题; (4) 加入抗体/酶的稀释液浓度太低; (5) 酶标仪滤光片不正确; (6) 不正确的试剂储存方式; (7) 试剂盒没有充分平衡; (8) 移液器吸液量不足, 吸嘴内壁挂水太多或内壁不清洁。	校正温育箱温度; 校正定时钟准确定时; 使用新鲜合格的蒸馏水; 按照说明书保存试剂盒和准确配制工作液; 试剂室温平衡至少 20 分钟, 确保所有试剂已平衡至室温 (18-25℃); 校正移液器, 吸嘴要配套, 装吸嘴时要紧密, 吸嘴内壁要清洁, 最好一次性使用。
2. 标准曲线和测定的重复性差	这是典型的由测定操作引起的问题, 包括 (1) 加样本及试剂量不准; 孔间不一致; (2) 加样过快, 孔间发生污染; (3) 加错样本; (4) 加样本及试剂时, 加在孔壁上部非包被区; (5) 不同批号试剂盒中组分混用; (6) 温育时间、洗板、显色时间不一致; (7) 孔内污染杂物; (8) 酶标仪滤光片不正确; (9) 试剂/样本没有混匀; (10) 血清样本未完全凝固即加入, 反应孔内出现纤维蛋白凝固或残留血细胞, 易出现假阳性反应等。	重复某一样本时, 加样时间尽可能与第一次接近; 重复测定样本, 操作条件、人员等应尽可能与上次保持一致, 以排除这些因素造成的不一致的可能性; 样本稀释前应充分混匀; 尽可能使用同一移液器并装紧吸嘴。
3. 白板 (阳性对照不显色)	(1) 漏加酶结合物; (2) 洗板液配制中出现的问题, 如量筒不干净, 含酶抑制物 (如叠氮钠) 等; (3) 添加的试剂错误或者被遗漏; (4) 试剂过期;	请按说明书所示稀释倍数配制; 注意不要漏加; 每次加液前均应核对标签。
4. 空白背景高	(1) 洗板不干净; (2) 显色液变质; (3) 试剂过期; (4) 试剂配制浓度有误, 如酶的浓度过高; (5) 蒸馏水受酶等污染; (6) 试剂混用; (7) 培养箱温度超过 37℃ 或反应时间过长。	浓缩洗液准确配制; 50 倍浓缩洗涤液如有结晶则应让结晶于室温全部溶解后再量取稀释; 充分洗涤, 彻底拍干; 加样或加酶拍板的滤纸应弃去不用, 不要反复使用, 否则易造成污染; 吸嘴尽可能一次性使用; 使用新鲜蒸馏水; 不同批号试剂勿混用; 请按说明书所示稀释倍数配制; 显色反应时间适当缩短。

(1601)