

人白介素-6 (IL-6) ELISA试剂盒 (酶联免疫分析法)

货号：CRS-B001

规格：96 tests

**重要提示：在进行实验之前请仔细阅读本手册。
本试剂盒仅用于科研使用，不可用于诊断或治疗应用。**

【预期用途】

该试剂盒用于检测人样本中白介素-6（IL-6）的浓度。试剂盒仅供科研使用。

【检测原理】

本试剂盒应用ELISA夹心法。微孔板预包被了Anti-IL-6 Antibody，样本或标准品中的Human IL-6与微孔板上固定的Anti-IL-6 Antibody以及 Biotin-Anti-IL-6-Antibody Solution 中生物素标记抗体结合，形成抗体-抗原-生物素标记抗体复合物，最后加入Streptavidin-HRP，用底物显色，随后用终止液终止，板孔中溶液会由蓝色变为黄色，使用酶标仪在450 nm和630 nm处测定样品吸光度值（OD_{450 nm}、OD_{630 nm}），OD值与样本中的人白介素-6（IL-6）含量呈正相关。

【注意事项】

1. 仅供科研使用，不可用于体外诊断；
2. 该试剂盒适用于细胞上清、血清和血浆样本；
3. 请在试剂盒有效期内使用；
4. 不同试剂盒及不同批号试剂盒的组分不能混用；
5. 样本值若大于标准曲线的最高值，应将样本用 1×Dilution Buffer 稀释后重新检测；若细胞上清样本需分步稀释，除最后一步用稀释剂稀释外，其它中间稀释可采用细胞培养基；
6. 检测结果的不同可由多种因素引起，包括实验人员的操作、移液器的使用方式、洗板技术、反应时间或温度、试剂盒的储存等；
7. 本试剂盒在设计上去除或降低了生物学样本中的一些内源性干扰因素，并非所有可能的影响因素都已经去除。

【产品组份】

表1.产品组份

Catalog	组份名称	规格 (96 T)	物理状态	存储条件	
				未开启	已开启
CRB001-C01	Pre-coated Anti-IL-6 Antibody Microplate	1 plate	固体	2-8°C	2-8°C
CRB001-C02	Human IL-6 Standard	20 µg×2	冻干粉	2-8°C	-70°C
CRB001-C03	Biotin-Anti-IL-6 Antibody Con. Solution	100 µL	液体	2-8°C	2-8°C
CRB001-C04	Biotin-Antibody Dilution Buffer	8 mL	液体	2-8°C	2-8°C
CRB001-C05	Streptavidin-HRP Con. Solution	0.5 mL	液体	2-8°C, 避光	2-8°C, 避光
CRB001-C06	Streptavidin-HRP Dilution Buffer	15 mL	液体	2-8°C	2-8°C
CRB001-C07	20× Washing Buffer	50 mL	液体	2-8°C	2-8°C
CRB001-C08	1× Dilution Buffer	15 mL×2	液体	2-8°C	2-8°C
CRB001-C09	Substrate Solution	12 mL	液体	2-8°C, 避光	2-8°C, 避光
CRB001-C10	Stop Solution	6 mL	液体	2-8°C	2-8°C

【储存条件及有效期】

1. 未开封：试剂盒保存于 2-8°C，试剂盒自生产之日起有效期为 24 个月，有效期见外包装盒标签。
2. 已开封：试剂盒开封后各组份按照表 1 存贮条件保存，有效期自开封之日起为 30 天，未使用完的微孔板条需与干燥剂一起密封保存。

注：1. 不要使用过期试剂。

2. 冻干粉重构后需-70°C储存，建议冻融次数不要超过1次，分装规格不低于5 µg。

【需要但未提供的实验仪器与耗材】

1. 单道、多道微量移液器和移液器吸头：需满足10 µL、300 µL、1000 µL加样需求
2. 恒温培养箱

3. 酶标仪，含450 nm/630 nm波长
4. 离心管：1.5 mL，10 mL
5. 计时器
6. 试剂瓶
7. 超纯水或去离子水

【试剂准备】

使用前将所有试剂恢复至室温（20°C-25°C）。如果溶液中有晶体形成，需平衡溶液至晶体完全溶解（可将溶液放置于恒温培养箱37°C平衡10-15 min）。

按照表2建议，用超纯水将所提供的冻干品配制成存储溶液，在室温下溶解15至30分钟，轻轻吹吸混匀，避免剧烈摇动或涡旋。重构的存储液应在-70°C保存，建议冻融次数不要超过1次，分装规格不低于5 µg。

表2. 配制方法

Catalog	组份名称	规格 (96 T)	存储液浓度	重构水体积
CRB001-C02	Human IL-6 Standard	20 µg	20 µg/mL	1000 µL

【检测流程】

1. 工作液配制

1.1 配制1× Washing Buffer:

取50 mL 20× Washing Buffer，用超纯水/去离子水稀释并定容至1000 mL，轻轻混匀。

1.2 配制Biotin-Anti-IL-6 Antibody Solution:










用30 µL Biotin-Anti-IL-6 Antibody Con. Solution加入6 mL Biotin-Antibody Dilution Buffer，轻轻摇匀，该工作液需现用现配。

1.3 配制Streptavidin-HRP Solution:

用240 µL Streptavidin-HRP Con. Solution加入12 mL Streptavidin-HRP Dilution Buffer，轻轻摇匀，该工作液需避光保存，现用现配。

2. 制备标准曲线

复溶后标准品（CRB001-C02）的浓度为 **20 µg/mL**，取 **5 µL** 的标准品储存液，加入到 **995 µL** 的稀释液中（Cm），然后取 Cm 溶液 **4 µL**，加入到 **996 µL** 的稀释液中（Std.-1），作为标准曲线的最高浓度 **Std.-1（400 pg/mL）**。在后续每一个离心管中加入 **500 µL** 稀释液，使用高浓度标准品做 1:1 系列稀释。每次移液时，确保充分混匀。以稀释液作为标准曲线的零浓度。

Tubes/ Solution Code	Human IL-6 stock solution	Cm	Std.-1	Std.-2	Std.-3	Std.-4	Std.-5	Std.-6	Std.-7
Operating									
Solution Con.	20 µg/mL	100 ng/mL	400 pg/mL	200 pg/mL	100 pg/mL	50 pg/mL	25 pg/mL	12.5 pg/mL	6.25 pg/mL
Dilution Buffer Vol.		995 µL	996 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL

3. 加入样品和生物素抗体溶液

将待测样品和系列稀释后的标准品加入反应孔内，每孔加入 **50 µL**。同时，每孔加入 **50 µL** 的 Biotin-Anti-IL-6 Antibody Solution。

注：待测样品和标准曲线建议设置复孔。

4. 孵育

用封板膜封板，室温孵育 **1.0 h**。

5. 洗板

小心揭开封板膜，弃去孔中液体，每孔加入 **300 µL 1× Washing Buffer**，轻轻敲击板 1 分钟后，弃去孔中的 **1× Washing Buffer**，每次洗板后，需在吸水纸上拍干。共洗板 **5 次**。

6. 加入 Streptavidin-HRP Solution

在对应板孔内加入 **100 µL Streptavidin-HRP Solution**，该工作液现用现配，避光保存。

7. 孵育

用封板膜封板，室温孵育 **30 min**。

8. 洗板

重复步骤 5 洗板。

9. 显色

每孔加入 100 μ L Substrate Solution。用封板膜封板，需避光，室温孵育 **15 min**。

10. 终止

每孔加入 50 μ L Stop Solution，轻轻震荡酶标板至混合均匀。

注：孔中液体由蓝色完全变为黄色。

11. 读数

用酶标仪测定各孔在 450 nm 和 630 nm 波长的吸光值，请在终止后 10 分钟内读数。

注：各孔 OD_{450 nm}扣除OD_{630 nm}读值可降低背景干扰。

【结果分析】

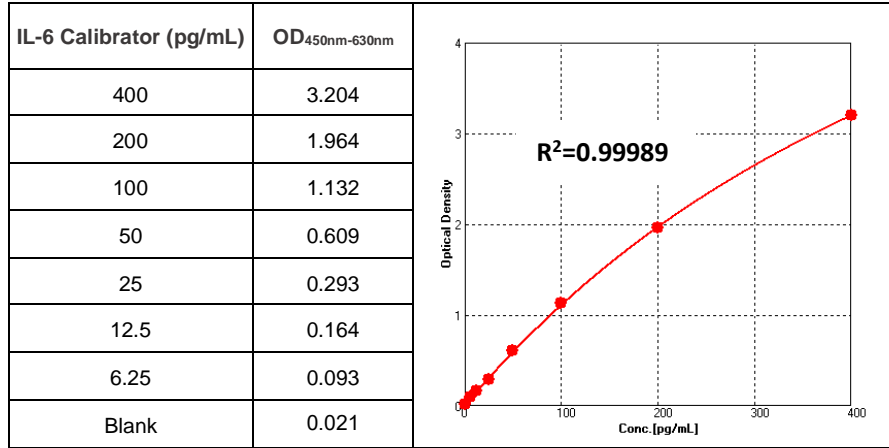
- a. 将标准品和样本的复孔读数求取平均值，然后减去零浓度标准品的 OD 值。
- b. 以标准品的浓度作为横坐标，OD 值作为纵坐标，利用四参数拟合绘制标准曲线，进行样本浓度的计算，计算浓度时需乘以相应的稀释倍数。若利用直线回归拟合，需选取合适的绘制区间，从而得到最佳的拟合曲线，保证回归分析的准确性。
- c. 标准曲线 R^2 应大于 0.9900。
- d. 标准曲线范围：6.25 pg/mL-400 pg/mL。大于分析标准曲线范围的样品应报告为大于 400 pg/mL 或稀释样品使其在线性范围内。小于分析标准曲线的样品应报告为小于 6.25 pg/mL。

【检测流程简述】



【典型数据】

每次实验，每块酶标板都需要设置标准曲线，以下标准曲线数据仅供参考。



【灵敏度】

人 IL-6 的最低可检测浓度为 2.0 pg/mL(3 次独立实验的平均值)。20 个零标准品浓度 OD 的平均值加上两倍 SD，计算最低可检测浓度。

【精密度】

a. 酶标板内精密度

3 个已知浓度的样本在一块酶标板内重复测试 10 次，以评估酶标板内的精密度。

b. 酶标板间精密度

在 3 个酶标板上测试 3 个已知浓度的样本，每板重复测试 10 次，以评估酶标板间的精密度。

样本	酶标板内精密度			酶标板间精密度		
	1	2	3	1	2	3
n	10	10	10	30	30	30
平均值(pg/mL)	772.00	624.00	457.20	839.47	588.80	438.27
标准差	42.13	20.49	19.28	37.38	29.53	21.66
变异系数(%)	5.46	3.28	4.22	4.45	5.02	4.94

【准确度】

5份健康人血清中加入3个不同浓度的人IL-6，未加入人IL-6的血清作为本底，计算回收率。

样品类型	平均回收率%	范围%	
血清 (n=5)	104.40	92.24	114.49

【稀释线性】

将高浓度的人IL-6加入到不同的稀释基质中，进行梯度稀释，评估检测的线性。

		血清
1:2	平均回收率%	108.23
	范围(%)	98.89-112.70
1:4	平均回收率%	97.06
	范围(%)	91.96-98.45
1:8	平均回收率%	106.97
	范围(%)	103.40-109.99

【特异性】

本试剂盒可识别天然和重组的人IL-6。下面列出的因子进行特异性测定，未观察到明显的交叉反应。

人	
IL-2	IL-7
IL-4	TNF- α
IL-10	IL-1 β
GM-CSF	IL-15
IFN- γ	IL-21

【校准】

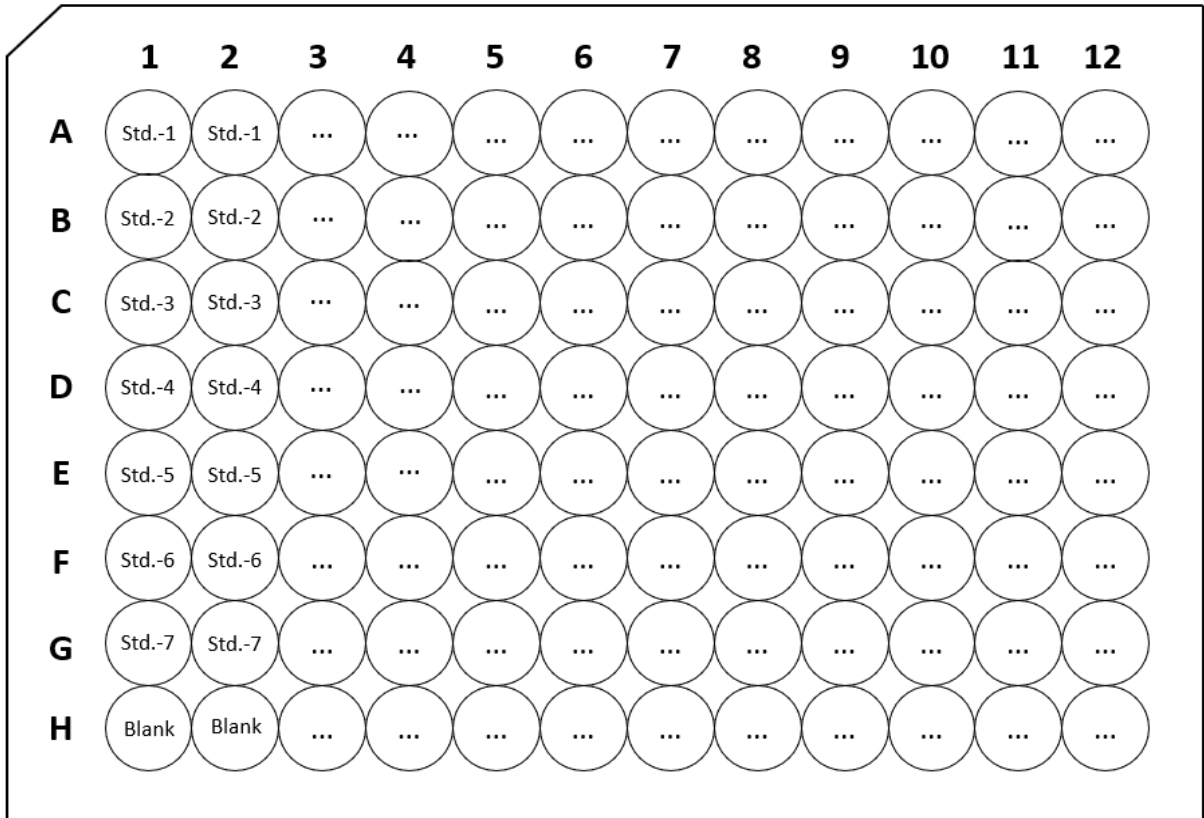
本试剂盒的标准品经大肠杆菌表达的高纯度重组人 IL-6 (89/548)校准，后者由英国国家生物标准与检定所/世界卫生组织于 2013 年 4 月进行校准。

校准结果如下：

NIBSC/WHO (89/548) approximate value (U/mL) = 0.1×Human IL-6 value (pg/mL)。

【PLATE LAYOUT】

建议使用此平板布局记录标准品和样品



注：Blank为空白对照1× Dilution Buffer孔。

【实验过程中可能遇到的问题及解决方案】

问题	可能的原因	解决办法
标准曲线差	* 移液不准确	* 检查移液器
CV 值偏高	* 移液不准确 * 孔中有气泡	* 检查移液器 * 去除孔中的气泡
背景高	* 板子清洗不充分 * 洗涤缓冲液被污染	* 按操作步骤正确清洗 * 制备新的洗涤缓冲液
整板读数偏低	* 波长选择错误 * 孵育时间不足	* 检查波长参数 * 增加孵育时间
标准曲线正常， 样品读值高	* 样本中的细胞因子水平高于检测范围	* 稀释样本再次进行检测
曲线漂移	* 加样时间过长 * 试剂不在室温下	* 在检测开始之前准备好所有的标准品和样品，尽量控制加样时间 * 除非抗体等物质有特殊说明，否则在加样前所有试剂都处于室温状态