

目录

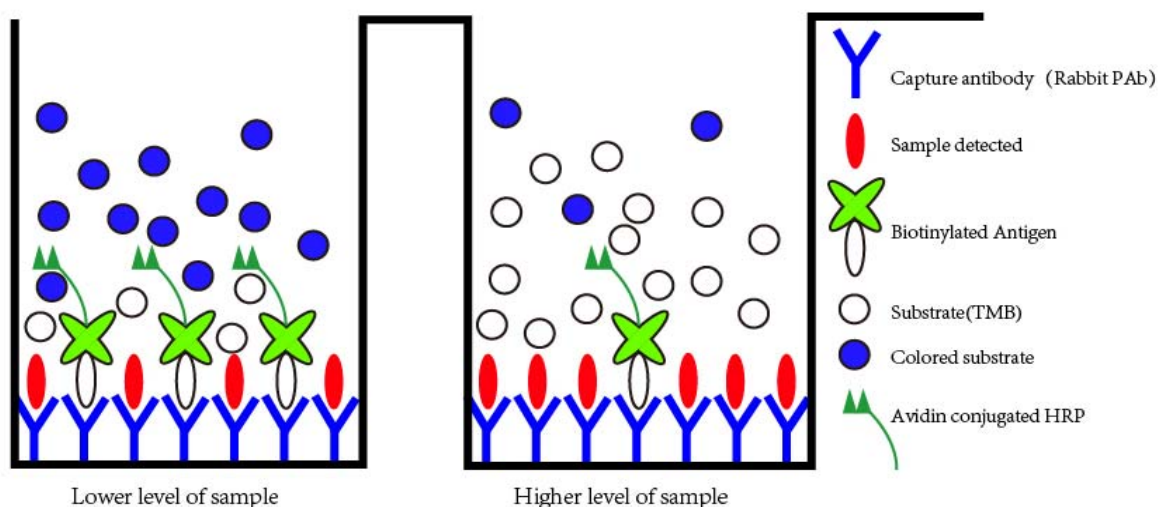
1. 背景介绍
2. 实验原理
3. 试剂盒组成
4. 试剂盒保存
5. 需要而未提供的试剂和器材
6. 试剂准备
7. 样本前处理
8. 洗板方法
9. 详细操作程序
10. 操作简程
11. 操作流程图
12. 结果计算
13. 性能参数
14. 局限性
15. 必要说明
16. 文献

1.背景介绍

IL-6 主要由巨噬细胞、T 细胞、B 细胞等多种细胞产生，是一种多功能的细胞因子，调节免疫应答、血细胞生成、组织损伤时的急性时相反应、炎症反应等。在心脑血管疾病、肾脏疾病、肿瘤、关节炎、创伤、感染等疾病发生时，IL-6 水平增高。IL-6 上升的水平与疾病的活动期、肿瘤的发展变化、排斥反应程度以及治疗效果都密切相关

2.实验原理：

本试剂盒采用竞争法检测样本中白细胞介素-6（IL-6)的含量。向预先包被了抗体的酶标孔中加入样本，再加入生物素标记的识别抗原，在 37℃下孵育 30min，两者与固相抗体竞争结合形成免疫复合物，经 PBST 洗涤除去未结合的生物素抗原，然后加入亲和素-HRP，在 37℃下孵育 30min,亲和素-HRP 与生物素抗原结合，洗涤后结合的 HRP 催化 TMB（四甲基联苯胺）成蓝色，随后在酸的作用下转化成黄色，在 450nm 波长下有吸收峰，吸光值与样本中抗原的浓度成负相关



3.试剂盒组成：

试剂盒组成	48 孔配置	96 孔配置	保存
说明书	1 份	1 份	
封板膜	2 片 (48)	2 片 (96)	
密封袋	1 个	1 个	
酶标包被板	1×48	1×96	长期-20℃
标准品 (冻干粉)	2 支 (定容至 150 μl)	2 支 (定容至 150 μl)	2-8℃
标准品/样品稀释液	3ml×1 瓶	6ml×1 瓶	2-8℃
生物素抗原 (冻干粉)	1 支 (稀释到 3ml)	1 支 (稀释到 6ml)	长期-20℃
亲和素-HRP (浓缩液)	50 μl (稀释到 3ml)	100 μl (稀释到 6ml)	长期-20℃
生物素抗原稀释液	3ml×1 瓶	6ml×1 瓶	2-8℃
亲和素-HRP 稀释液	2.95ml×1 瓶	5.9ml×1 瓶	2-8℃
显色剂 A 液	3ml×1 瓶	6ml×1 瓶	2-8℃
显色剂 B 液	3ml×1 瓶	6ml×1 瓶	2-8℃
终止液	3ml×1 瓶	6ml×1 瓶	2-8℃
浓缩洗涤液	(20ml*25 倍) ×1 瓶	(20ml*25 倍) ×1 瓶	2-8℃

备注：

- 1) 试剂盒中“标准品/样品稀释液”为超纯水（可用双蒸水替代），“终止液”为 2M 的 H₂SO₄，洗涤液为含 0.15%吐温-20 的 PBST，如不够可自行配制。
- 2) 不同公司的缓冲体系存在较大差异，请勿将本试剂盒的试剂与其他公司的试剂混用以影响实验结果。
- 3) 浓缩洗涤液在低温下会有少量盐类析出，稍微加温后即会消失，不影响使用。
- 4) 浓缩生物素抗原和浓缩亲和素-HRP 稀释前务必先离心同时应避免反复冻融

4.试剂盒保存

本试剂盒可以在 2-8℃下保存 6 个月，在-20℃下可以保存更长的时间。酶标板为真空包装，板条可以拆卸，拆开以后如一次不能用完，请放入提供的密封袋中，放入干燥剂，2-8℃保存，在一个月之内仍然有效。试剂不能反复冻融。

5.需要而未提供的试剂和器材

- 1) 37℃恒温箱。
- 2) 标准规格酶标仪。
- 3) 精密移液器及一次性吸头
- 4) 双蒸水或超纯水
- 5) 干净的试管或 Eppendof 管
- 6) 吸水纸
- 7) 自动洗板机或 8 道排枪
- 8) ELISA 数据处理软件，推荐使用 ELISACalc
- 9) 500ml 烧杯的和适当量程的量筒

6.样本处理

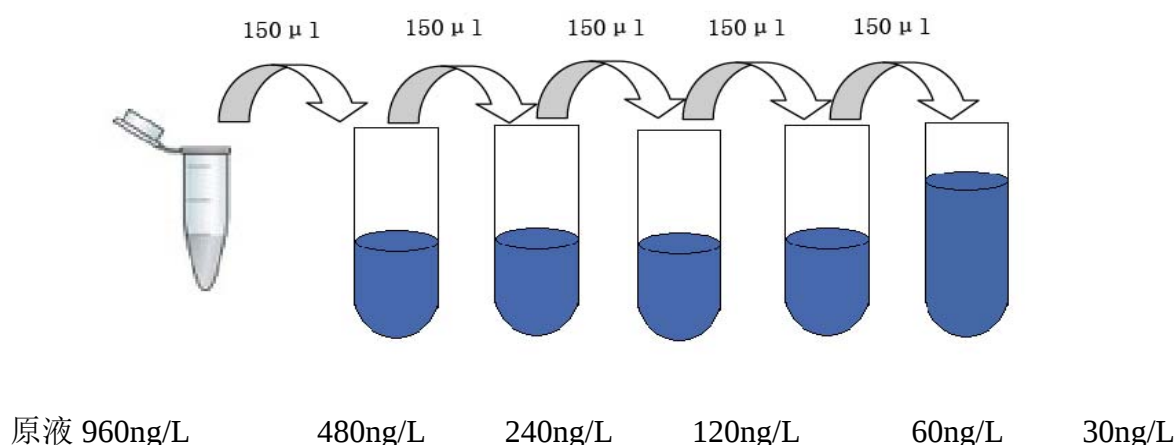
- 1) 标本采集后尽早进行提取，提取按相关文献进行，提取后应尽快进行实验。
若不能马上进行试验，可将标本放于-20℃保存，但应避免反复冻融。
- 2) 血清：室温血液自然凝固 10-20 分钟，离心 20 分钟左右（2000-3000 转 / 分）。
仔细收集上清，检测前如有沉淀，应再次离心。
- 3) 血浆：应根据检测指标的要求选择 EDTA 或枸橼酸钠或肝素作为抗凝剂，混合 10-20 分钟后，离心 20 分钟左右（2000-3000 转 / 分）。仔细收集上清，检测前如有沉淀，应再次离心。
- 4) 尿液：用无菌管收集，离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分）。仔细收集上清，保存过程中如有沉淀形成，应再次离心。胸腹水、脑脊液参照实行。
- 5) 细胞培养上清：检测分泌性的成份时，用无菌管收集。离心 20 分钟左右（2000-3000 转 / 分）。仔细收集上清。检测细胞内的成份时，用 PBS

(PH7.2-7.4) 稀释细胞悬液, 细胞浓度达到 100 万/ml 左右。通过反复冻融, 以使细胞破坏并放出细胞内成份。离心 20 分钟左右 (2000-3000 转/分)。仔细收集上清。保存过程中如有沉淀形成, 应再次离心。

- 6) 组织标本: 切割标本后, 称取重量 (1g), 加入一定量 (9ml) 的 PBS (PH7.4)。用手工或匀浆器将标本匀浆充分。离心 20 分钟左右 (2000-3000 转/分)。仔细收集上清。分装后一份待检测, 其余冷冻备用。样本不足 1g, 按照 1: 9 加入 PBS 后匀浆即可。

7. 试剂准备

- 1) 使用前所有试剂应置于室温平衡至少 30 分钟。
- 2) 本试剂盒可以直接加样, 如浓度过高, 可以进行适当比例的稀释 (推荐 2-5 倍稀释), 计算时应将结果乘以稀释的倍数。
- 3) 洗涤液为 25 倍浓缩液, 使用前将所有洗涤液倒入 500ml 或 1L 的烧杯中, 用双蒸水定容到 500ml 即为工作液。
- 4) 标准品的稀释: 先用标准品/样品稀释液将标准品冻干粉定容到 150 μ l, 然后漩涡混匀 30 秒即为标准品原液 (24 小时内用完)。取 5 支干净的 Eppendorf 管, 每管加 150 μ l 的标准品稀释液, 分别标记上 480ng/L, 240ng/L, 120ng/L, 60ng/L, 30ng/L。取 150 μ l 标准品原液加入标记 480ng/L 的管中, 混匀后同样取出 150 μ l, 加入下一管, 以此类推直至最后一管。零孔: 直接加标准品/样品稀释液。(见下图)



- 5) 生物素抗原的稀释：抽取生物素抗原稀释液 1ml 到浓缩型生物素抗原中，漩涡混匀 15 秒至冻干粉完全溶解，然后将所有液体移入稀释液瓶中，再次漩涡混匀 30 秒即为生物素抗原工作液。
- 6) 亲和素-HRP 的稀释：低速离心（使浓缩液全部沉到管底），将浓缩亲和素-HRP 全部移入相应稀释液中然后漩涡混匀 30 秒即为亲和素-HRP 工作液。

8.洗板方法

- 1) 手工洗板：先洗去酶标孔中的液体，在吸水纸上拍干，然后每孔加入 300 μ l 稀释好的洗涤液，轻轻摇晃 30 秒，然后甩掉，在吸水纸上拍干，重复 4-5 次。
- 2) 洗板机洗板：洗板机洗板比较便捷，但应操作熟练后使用。

9.详细操作程序

- 1) 使用前请先将试剂盒在室温下平衡半小时。
- 2) 空白孔不加样，只加显色剂 A，B 和终止液用于调零。
- 3) 标准品孔：每孔加入稀释好的标准品 50 μ l，零孔加入标准品/样品稀释液 50 μ l，然后加入生物素抗原工作液 50 μ l(零孔必须要做，并将其作为标曲的最

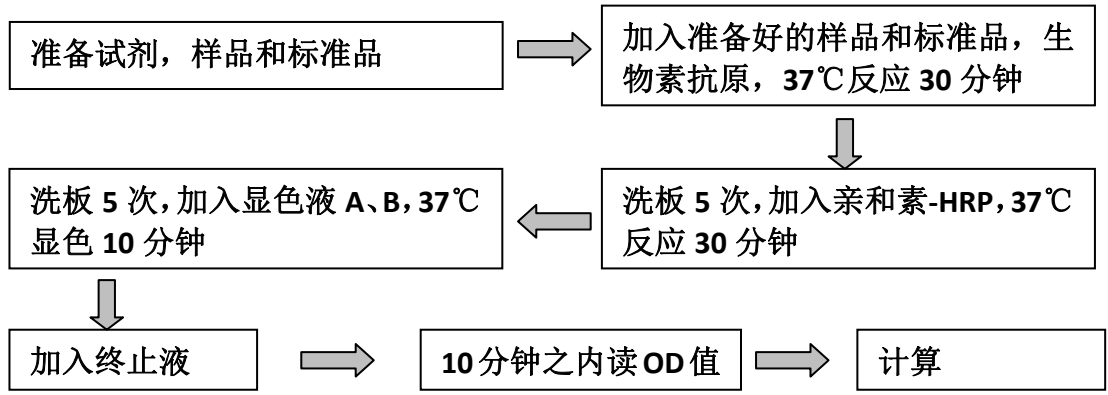
后一个点)。

- 4) 样品孔：加入样品 50 μ l（推荐直接加样，浓度高可以用样品稀释液稀释 2-5 倍），然后加入生物素抗原工作液 50 μ l。
- 5) 轻轻摇晃，盖上封板膜，37℃培养箱中孵育 30min。
- 6) 将 25 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 25 倍稀释后备用。
- 7) 第一次洗涤：小心揭掉封板膜，弃去液体，甩干，每孔加满洗涤液，静置 30 秒后弃去，如此重复 5 次，拍干。
- 8) 加入 50 μ l 亲和素-HRP 到标准品孔和样品孔中，轻轻摇晃，盖上封板膜，37℃培养箱中孵育 30min。
- 9) 第二次洗涤：小心揭掉封板膜，弃去液体，甩干，每孔加满洗涤液，静置 30 秒后弃去，如此重复 5 次，拍干。
- 10) 显色：每孔先加入显色剂 A 50 μ l，再加入显色剂 B 50 μ l，轻轻震荡混匀，37℃避光显色 10 分钟。
- 11) 终止：每孔加终止液 50 μ l，终止反应（此时蓝色立转黄色）。
- 12) 测定：以空白孔调零，450nm 波长依序测量各孔的吸光度（OD 值）。测定应在加终止液后 10 分钟以内进行。
- 13) 计算：根据浓度和 OD 值算出标准曲线的回归方程，建议用专用计算软件进行计算，推荐使用 ELISAcalc 进行计算，拟合模型选用 logistic 曲线（四参数）。

10.操作简程

实验准备	1. 实验防护				
	2. 实验相关设备和仪器准备				
	3. 样品和试剂常温平衡 30min				
	4. 标准品按梯度稀释				
	5. 洗涤液 25 倍稀释				
	6. 生物素抗原稀释				
	7. 亲和素 HRP 稀释				
实验操作	操作顺序	空白孔	标准品孔	样品孔	零孔
	1		各梯度标准品 50ul	样品 50ul	标准品稀释液 50ul
	2		生物素抗原 50ul	生物素抗原 50ul	生物素抗原 50ul
	3	轻轻摇晃，盖上封板膜，37℃培养箱中孵育 30min			
	4	每孔加满洗涤液，静置 30:秒后弃去，如此重复 5 次，拍干			
	5		加亲和素 HRP50ul	加亲和素 HRP50ul	加亲和素 HRP50ul
	6	轻轻摇晃，盖上封板膜，37℃培养箱中孵育 30min			
	7	每孔加满洗涤液，静置 30:秒后弃去，如此重复 5 次，拍干			
	8	显色剂 A 50ul 再显色剂 B 50ul	显色剂 A 50ul 再显色剂 B 50ul	显色剂 A 50ul 再显色剂 B 50ul	显色剂 A 50ul 再显色剂 B 50ul
	9	轻轻震荡混匀， 37℃避光显色 10 分钟			
	10	加终止液 50ul	加终止液 50ul	加终止液 50ul	加终止液 50ul
	11	10 分钟内 450nm 波长依序测量各孔的吸光度（OD 值）			
计算	根据浓度和 OD 值算出标准曲线的回归方程，再依据方程计算样本浓度。				

11. 操作流程图：

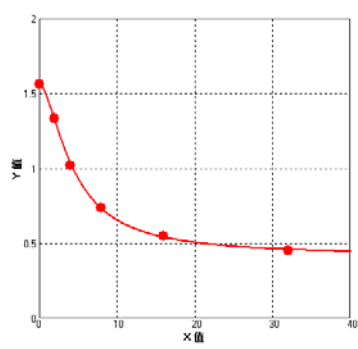


12. 结果计算

1) 推荐使用 ELISAcade 进行计算，拟合模型选用 logistic 曲线（四参数）。软件可以官网 www.lengton.com.cn 下载或联系我们提供。

2) 标曲示意图如下：

浓度	Blank	S5	S4	S3	S2	S1	S0
OD 值	VB	V5	V4	V3	V2	V1	V0
校准值	VB-VB	V5-VB	V4-VB	V3-VB	V2-VB	V1-VB	V0-VB



13. 性能参数

- a. 批内差：CV<10%
- b. 批间差：CV<12%

c. 灵敏度：2.145ng/L

d. 检测范围：3-480ng/L

14.局限性

- 1) 实验人员，操作习惯、洗涤技术、孵育温度、显色时间及试剂盒保存时间等因素的改变都会影响实验的效果。
- 2) 本试剂盒已经尽力去除或降低了生物学样本中内源性干扰因素，但非所有可能的影响因素全部排出。
- 3) 样本浓度仅在盒子设计的检测范围内可以检测，超出范围无法检测。
- 4) 样本反复冻融或溶血会影响实验结果。

15.必要说明

- 1) 本试剂盒用于科学研究，不能用于诊断治疗。
- 2) 试剂盒中化学试剂具有潜在危害，操作时请佩戴白大衣、我胶手套、安全眼镜等防护设施。
- 3) 试剂盒中的终止液为酸性溶液，在使用终止液时，请佩戴防护服，及防护眼睛、手及西部的设施。以避免试剂接触皮肤和眼睛。如不慎接触，请立即用大量清水清洗，及时就医。
- 4) 请不要使用其他批号或其他来源的试剂替代本试剂盒中的试剂。
- 5) 请不要使用过期的试剂。
- 6) 在试剂盒的贮存或孵育过程请避免强光照射。
- 7) 在操作试剂盒或处理样本的区域请不要饮食。
- 8) 不要让试剂或样本接触皮肤和粘膜，操作试剂盒或处理样本时请佩戴乳胶或

一次性手套。

- 9) 显色底物避免与氧化试剂和金属接触，显色底物在使用之前必须平衡至室温。
- 10) 为了避免微生物的精染，以及试剂与样本间的交叉宿染，请使用一次性枪头。
- 11) 使用干净的容器配制试剂，试剂的准备必须使用蒸饱水或去离子水。
- 12) 暴露于酸性环境会抑制结合。
- 13) 不同公司的缓冲体系存在较大差异，请勿将本试剂盒的试剂与其他公司的试剂混用。
- 14) 浓缩恍涤液在低温下会有少量盐类析出，稍微加温后即会消失，不影响使用。
- 15) 浓缩生物素抗原和浓缩亲和素—HRP:稀释前务必先离心同时应避免反复冻融。
- 16) 样本可能含有传染性病原体，处理样本和可能的污染材料的首选方法 121.5C,60min。
- 17) 实验剩余试剂、样本的处理请遵循生化实验室废弃物处理的相关规定进行。

16.文献

- 1) MC-002 exhibits positive effects against platelets aggregation and endothelial dysfunction through thromboxane A2 inhibition 《Thrombosis Research》, 2014 , 133 (4) :610
- 2) salvia miltiorrhiza bunge (danshen) extract attenuates permanent cerebral ischemia through inhibiting platelet activation in rats 《Journal of Ethnopharmacology》, 2017 , 207
- 3) Catalpol prevents alteration of cholesterol homeostasis in non-alcoholic fatty liver disease via attenuating endoplasmic reticulum stress and NOX4 over-expression 10.1039/C6RA26046B RSC Adv., 2017, 7, 1161-1176
- 4) Preventive Potential of Resveratrol in Carcinogen-Induced Rat Thyroid Tumorigenesis Nutrients 2018, 10(3), 279; doi:10.3390/nu10030279
- 5) Protective effects of hydrogen-rich saline in uncontrolled hemorrhagic shock. 《 Experimental & Therapeutic Medicine》, 2014 , 7 (5) :1253-1258
- 6) Temperature modulates hepatic carbohydrate metabolic enzyme activity and gene expression in

- juvenile GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed a carbohydr... 《 Journal of Thermal Biology》 , 2014 , 40 (1) :25
- 7) p-JAK2 plays a key role in catalpol-induced protection against rat intestinal ischemia/reperfusion injury 10.1039/C7RA10506A RSC Adv., 2017, 7, 54369-54378
 - 8) Induction of a robust immunity response against novel duck reovirus in ducklings using a subunit vaccine of sigma C protein 《Scientific Reports》 , 2016 , 6 :39092
 - 9) p-Syneprine suppresses lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibition of the NF- κ B signaling pathway 《Inflammation Research》 2014.6,63(6):429 - 439
 - 10) melatonin implantation from winter solstice could extend the cashmere growth phase effectively 《Small Ruminant Research》 , 2011 , 99 (1) :48-53
 - 11) 富氢生理盐水对非控制性失血性休克大鼠血浆炎症和氧化损伤因子的影响 《中华实验外科杂志》 2013,30 (11)
 - 12) Mouse duodenum as a model of inflammation induced by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 《Journal of Veterinary Research》 , 2016 , 60 (1) :19-23
 - 13) BMP4-mediated brown fat-like changes in white adipose tissue alter glucose and energy homeostasis 《Pnas》 , 2013 , 110 (9) :E798-E807
 - 14) 肠易激综合征患者肠黏膜 SP、SPR 和 D5-HT 的变化 《世界华人消化杂志》 2009 ,17(30):3169-3173
 - 15) 3 种品系尼罗罗非鱼生长及高密度胁迫后生理响应变化的比较 《中国水产科学》 2014(1):142-152
 - 16) apelin 对实验性大鼠肺动脉高压的影响 《中华临床医师杂志》 2013(3):1143-1145
 - 17) 饲料维生素 D 添加水平对生长獭兔生长性能、钙磷代谢、血液指标和抗氧化功能的影响 《动物营养学报》 , 2014 , 26 (2) :389-396
 - 18) 饲料蛋白质水平对尼罗罗非鱼幼鱼生长性能、体组成、血液学指标和肝脏非特异性免疫指标的影响 《动物营养学报》 , 2012 , 24 (12) :2384-2392
 - 19) 急性冠状动脉综合征患者可溶性 OX40 配体与基质金属蛋白酶 9 的变化 《中华老年心脑血管病杂志》 2010.8,12(8):751
 - 20) 试论“野菊花提取物”对糖尿病肾病大鼠的影响及作用机制 《中国现代应用药学》 2015, 32(7):791-795
 - 21) 分化型甲状腺癌术后复发患者血管内皮生长因子及内皮抑素在血清中表达的临床意义 《中国医师杂志》 2012,14(7):969-972
 - 22) 内皮脂肪酶基因 584C_T 多态性及其血清水平与急性心肌梗死的相关性 《临床心血管病杂志》 2013,29(11)864-867
 - 23) 皮肤划痕症患者治疗前后血中组胺含量及氧化活性能力测定 《中华皮肤科杂志》 2011.6, 44 (6) 393-395
 - 24) 影响射频消融治疗大肝癌临床疗效的因素探讨 《现代肿瘤医学》 2011.11, 19 (11) 2272-2275