

## 人IL-4双抗夹心ELISA检测试剂盒

请在实验前仔细阅读本说明书

产品货号: KE00232  
规格: 96T  
灵敏度: 1.4 pg/mL  
检测范围: 15.6 - 500 pg/mL  
用途: 此试剂盒用于定量检测血清、血浆以及细胞上清中人IL-4浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

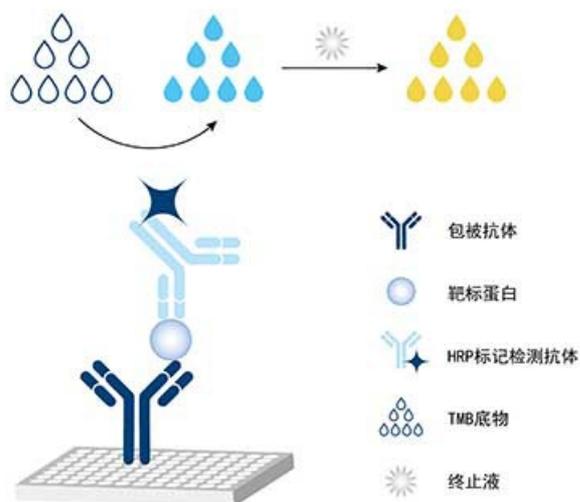
# 目录

一：背景信息	3
二：检测原理	3
三：需自备的实验器材	3
四：试剂盒组分及储存	4
五：实验注意事项	4
六：样本准备	4
七：试剂准备	5
八：实验步骤	6
九：实验参数	7
9.1 参考标曲图	7
9.2 精密度	7
9.3 加标回收率	7
9.4 样本值	8
9.5 灵敏度	8
9.6 线性	8
十：参考文献	9

## 一：背景信息

白介素-4 (Interleukin-4, IL-4) 是 $\alpha$ -螺旋细胞因子家族的成员, 由活化的CD4+T细胞、嗜碱性细胞和肥大细胞产生, 能促进抗原呈递细胞的增殖和分化。IL-4还在抗体同型转换中起关键作用, 刺激IgE的产生。这种细胞因子已被用于治疗自身免疫性疾病, 如多发性骨髓瘤、癌症、牛皮癣和关节炎。另外, IL-4具有许多生物学作用, 包括刺激活化B细胞和T细胞增殖, 以及B细胞分化为浆细胞, 可作为体液和适应性免疫的关键调节因子。

## 二：检测原理



### ◀双抗夹心模式图 (检测抗体直标HRP)

按操作顺序形成抗体夹心结构后, 加入TMB底物, 板孔液体由无色变成蓝色, 再加入终止液液体变为黄色后进行吸光度值测定。

## 三：需自备的实验器材

- 3.1 酶标仪 (可读取450 nm和630 nm双波长);
- 3.2 高精度移液器及一次性移液器枪头;
- 3.3 洗板机 (亦可手动洗板);
- 3.4 EP管 (用于稀释标准品及样本);
- 3.5 吸水毛巾或滤纸 (用于拍干);
- 3.6 烧杯和量筒;
- 3.7 用于ELISA实验的数据分析的统计拟合软件 (推荐四参数拟合方法), 如: Origin, ELISA Calc等。

## 四：试剂盒组分及储存

英文名称	中文名称	规格	数量
Microplate	预包被酶标板 - 96孔板	8孔 × 12条	1 块
Protein standard	标准品 - 冻干粉状 *	1000 pg/瓶	2 瓶
Detection antibody, HRP-conjugated (100×)	HRP标记检测抗体浓缩液 (100×) **	120 μL/支	1 支
Additional Diluent AT-00232	干扰抑制剂 AT-00232 (仅用于人血清和血浆样本)	6 mL/瓶	1 瓶
Sample Diluent PT 1-ef	样本稀释液 PT 1-ef	30 mL/瓶	1 瓶
Detection Diluent	抗体稀释液	30 mL/瓶	1 瓶
Wash Buffer Concentrate (20×)	浓缩洗涤液 (20×)	30 mL/瓶	1 瓶
Tetramethylbenzidine Substrate (TMB)	显色底物 TMB	12 mL/瓶	1 瓶
Stop Solution	终止液	12 mL/瓶	1 瓶
Plate Cover Seals	封板膜		4 张
<b>储存条件：</b> 1：未开启试剂盒可在2-8℃条件下存放6个月或者在-20℃条件下存放1年 2：已开启试剂盒可在2-8℃存放7天 3：每次实验均使用新的标准品,使用后丢弃			

\* 使用对应的样本稀释液对标准品进行复溶，复溶过程避免产生气泡

\*\* 开盖前请离心

## 五：实验注意事项

- 5.1 避免皮肤接触终止液以及TMB 显色液；
- 5.2 在实验过程中，注意穿戴个人防护装备，如实验服，手套，口罩和护目镜；
- 5.3 请勿将不同批次的试剂进行混用，过期产品请勿使用；
- 5.4 在使用自动洗板机时，板孔加入洗涤液之后，设置30秒的浸泡程序，以提高分析的精确度。

## 六：样本准备

- 6.1 血清：全血标本室温凝固 30 min后1000×g 离心15 min，取上清立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融。
- 6.2 血浆：可用EDTA、肝素或柠檬酸盐作为抗凝剂，标本采集后1000×g 离心15 min，立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融  
(注意：标本溶血会影响检测结果，因此溶血标本不宜进行检测)。
- 6.3 细胞上清：收集细胞培养液，500×g 离心5 min取上清，立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融。

## 七：试剂准备

### 7.1 洗涤液 (1×)：

如果洗涤液 (20×) 有晶体析出, 37°C加热至晶体全部溶解。按1:20稀释倍数进行稀释: 如取30 mL 浓缩洗涤液 (20×), 加入570 mL 超纯水或去离子水, 得到洗涤液 (1×)。

### 7.2 HRP标记检测抗体 (1×)：

开盖前瞬时离心, 按1:100比例进行稀释, 稀释前根据预先计算实验所需的总量配制 (100 μL/孔), 实际配制时应多配制0.1-0.2 mL。如10 μL HRP标记检测抗体浓缩液 (100×) 加 990μL 抗体稀释液进行配制, 轻轻混匀。

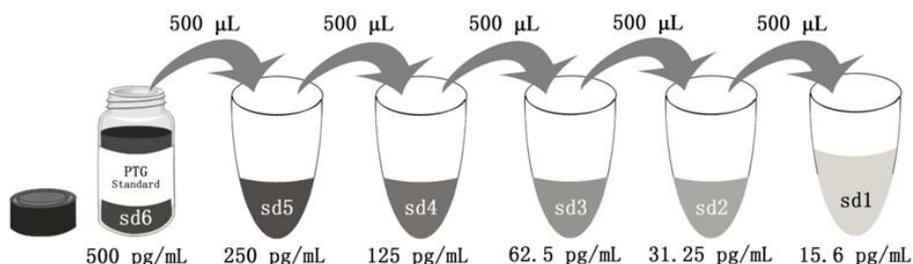
### 7.3 待检测样本：

不同的样本使用相应的样本稀释液进行稀释, 如果样本检测值超过标曲最高范围, 可将样本进行一定的稀释后再进行实验, 使样本的检测值处于标曲范围内, 不同样本的稀释倍数需自行优化。

稀释比推荐如下: 人血清和血浆样本1:2或1:4稀释; 细胞上清样本不稀释或1:2稀释; 样品采集、处理和储存的差异可能导致测值的改变。

### 7.4 梯度稀释的标准品：

使用2 mL PT 1-ef样本稀释液复溶标准品, 具体操作如下：



Add # μL of Standard diluted in the previous step	—	500 μL				
# μL of Sample Diluent PT 1-ef	2000 μL	500 μL				
	"sd6"	"sd5"	"sd4"	"sd3"	"sd2"	"sd1"

## 八：实验步骤

实验前,需要将所需试剂在室温平衡20-30 min(HRP标记 检测抗体浓缩液不需要平衡室温,即用即取);在进行标准品、样本以及不同试剂加样时,更换枪头,避免接触微孔板的内表面,不同的试剂,使用不同的加样槽;

8.1 根据实验用量,取出需要用到的酶标板条,剩余板条加入干燥剂放入铝箔袋密封后存放于4°C,并于一周之内用完;

8.2 分别设零孔、标准品孔、待测样本孔:

对于人血清和血浆样本,零孔、标准品孔以及待测样本孔预先加入50  $\mu$ L/孔干扰抑制剂溶液,不需要孵育和洗涤;

对于细胞上清样本,不需要加入干扰抑制剂,可直接进行下一步;

8.3 加样,零孔中加样本稀释液100  $\mu$ L,余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本100  $\mu$ L/孔;注意不要产生气泡(建议标准品和样本都做复孔,尽量避免实验误差,确保上样不间断,5-10 min完成加样);

8.4 酶标板盖上覆膜,37°C孵育60 min;

8.5 洗涤

1) 揭开封板膜(动作轻柔,避免动作过大导致液体溢出串孔),弃液体,拍干;

2) 洗涤液(1 $\times$ )洗涤板条,每孔350-400  $\mu$ L,洗涤后,甩掉液体拍干板条,重复此步骤4次,避免异物进入板孔以及板条干燥;

8.6 每孔加100  $\mu$ L HRP标记检测抗体(1 $\times$ )(参照试剂准备部分7.2),盖上封板膜,37°C孵育60 min;

8.7 重复步骤8.5;

8.8 显色:每孔加TMB显色液100  $\mu$ L,37°C避光显色 15-20 min(如果颜色偏浅,可适当延长显色时间,不超过30 min;保持显色底物始终处于避光状态,显色底物在加样前应是无色透明,如有变色,请勿使用);

8.9 终止:每孔加终止液100  $\mu$ L,蓝色变黄色。终止液与TMB显色液的加样顺序一致;(注意:眼睛和皮肤避免接触终止液);

8.10 读数:以630 nm为校正波长,用酶标仪在450 nm波长测量各孔的光密度(OD值)。加入终止液后5 min内进行读数,若无630 nm 波长,也可直接使用450 nm 波长读数;

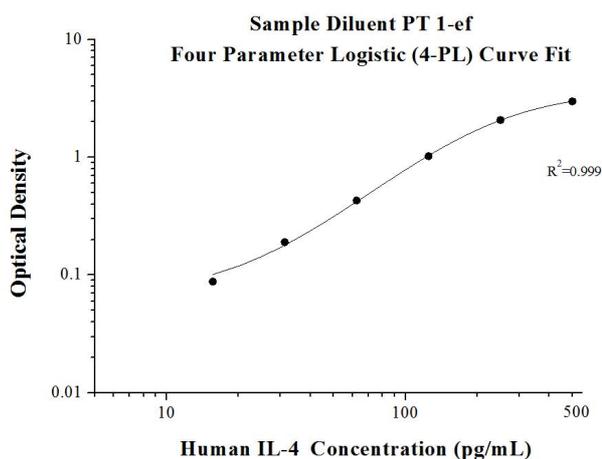
8.11 数据分析:每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值,设置复孔,取其平均值。以标准品的浓度为横坐标,OD 值为纵坐标,使用专业软件(如Origin、ELISACalc等)进行四参数拟合(4-PL),根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度,乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

操作流程如下:

步骤	试剂	体积	孵育时间	洗涤次数	孵育温度
1	干扰抑制剂(仅针对血清样本)	50 $\mu$ L	0 分钟	不需要洗涤	-
2	标准品或样本	100 $\mu$ L	60 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
3	HRP标记检测抗体(1 $\times$ )	100 $\mu$ L	60 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
4	显色 TMB	100 $\mu$ L	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37°C孵育,避光
5	终止液	100 $\mu$ L	0 分钟	不需要洗涤	-
6	加入终止液后以630 nm为校正波长,在450 nm处测量OD值,此过程建议不超过5分钟				

## 九：实验参数

### 9.1 参考标曲图



(pg/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.028 0.031	0.029	-
15.6	0.073 0.078	0.076	0.046
31.25	0.127 0.14	0.134	0.104
62.5	0.289 0.287	0.288	0.259
125	0.714 0.751	0.733	0.703
250	1.658 1.648	1.653	1.624
500	2.838 2.859	2.849	2.819

### 9.2 精密度

板内精密度：3个不同浓度的样本在板内重复测定 20次；

板间精密度：3个不同浓度的样本在板间重复测定 24次。

板内精密度 (CV内)				
样本	数量	平均值 (pg/mL)	标准差	变异系数CV%
1	20	108.93	6.05	5.6
2	20	204.09	11.31	5.5
3	20	442.97	13.98	3.2

板间精密度 (CV间)				
样本	数量	平均值 (pg/mL)	标准差	变异系数CV%
1	24	108.82	3.65	3.4
2	24	226.91	12.24	5.4
3	24	458.76	20.82	4.5

### 9.3 加标回收率

样本稀释后，在标曲范围内选择高、中、低3个浓度，进行人IL-4的加标回收率实验，结果如下；

样本类型	稀释倍数	均值 (%)	范围 (%)
人血浆	1:2	77	72-85
	1:4	80	70-114
细胞上清	1:2	101	88-123
	1:4	98	83-123

## 9.4 样本值

应用本试剂盒，检测来自人血清和血浆样本中人IL-4的浓度：

样本类型	均值 (pg/mL)	检出率 (%)	范围 (pg/mL)
人血清 (n=16)	18.9	31	ND*-63.3
人血浆 (n=16)	10.6	25	ND*-63

ND\*=Non-detectable

### 细胞上清：

在含有 10% 胎牛血清、100 U/mL青霉素，100 µg/mL硫酸链霉素的 RPMI-1640培养基中培养人外周血单个核细胞PBMC ( $1 \times 10^6$  cells/mL)。细胞分别在未刺激或10 µg/mL 植物血凝素PHA 刺激条件下培养1天或5天，收集细胞上清，并检测人IL-4的浓度：

刺激条件	1 天(pg/mL)	5 天 (pg/mL)
未刺激	-	-
刺激	27	-

## 9.5 灵敏度

用20个重复的零孔平均OD值加上两倍标准差得到的OD值带入标准曲线拟合出对应的浓度值，此试剂盒中人IL-4的灵敏度为1.4 pg/mL。

## 9.6 线性

人血浆样本加入高浓度的人IL-4蛋白，梯度稀释后检测样本加标线性，细胞上清样本用对应样本稀释液稀释样品检测样本线性，稀释后检测值应处于标曲范围内，线性如下：

稀释倍数		人血浆	细胞上清
原液	均值 (%)		100
	范围 (%)		-
1:2	均值 (%)	102	95
	范围 (%)	98-106	90-106
1:4	均值 (%)	122	
	范围 (%)	116-127	
1:8	均值 (%)	111	
	范围 (%)	109-114	
1:16	均值 (%)	111	
	范围 (%)	110-112	

## 十：参考文献

1. Dhanda SK. et al.(2013) Clin Dev Immunol. doi: 10.1155/2013/263952.
2. Müller-Hermelink N. et al. (2008) Cancer Cell.13: 507-18.
3. Leberman DA. et al. (1988) 168: 853-62.
4. provided by RefSeq, Jul 2008.