

Human IL-5 ELISA Kit 人 IL-5 ELISA试剂盒

【产品概述】

IL-5 是一种多效性细胞因子主要由 T 细胞 (1-4) 生产。在人类 IL-5 主要由活化 T 细胞产生, 在小鼠则由 Th2 亚群细胞产生。

人的 IL-5 由 134 氨基酸残基组成, 含 22 氨基酸残基信号肽, 2 个糖基化点, 人和小鼠 IL-5 基因分别定位于第 5 号和第 11 号染色体, 与 IL-3、IL-4、GM-CSF (1, 2) 等造血因子的基因密切连锁。人和鼠 IL-5 在氨基酸水平上有 70% 的同源性, 生物学作用有交叉反应。人和鼠 IL-5Ra 链有 79% 的同源性。

本实验采用双抗体夹心 ELISA。用抗人 IL-5 单克隆抗体预包被酶标板, 加入适度稀释的样本和标准品, 其中的 IL-5 会与单抗结合, 洗去游离成分; 加入生物素化的抗人 IL-5 抗体, 抗人 IL-5 抗体与结合在单抗上的人 IL-5 结合而形成免疫复合物, 洗去游离的成分; 加入辣根过氧化物酶标记的亲合素, 生物素与亲合素特异性结合, 洗去未结合的酶结合物; 加入显色剂, 若反应孔中有 IL-5, 辣根过氧化物酶会使无色的显色剂现蓝色; 加终止液变黄。在 450nm 下测 OD 值, IL-5 浓度与 OD450 值之间呈正比, 可通过绘制标准曲线计算出标本中 IL-5 浓度。

【产品规格及组分】

货号及规格	C644-01(48 Tests)	C644-02(96 Tests)	保存条件
1a标准品	1 支(冻干)	2 支(冻干)	4 °C
1b 标准品和标本稀释液	1 瓶	1 瓶	4°C
2a浓缩生物素化抗体 100×	1 支	2 支	4 °C
2b生物素化抗体稀释液	1 瓶	1 瓶	4 °C
3a浓缩酶结合物 100×	1 支	2 支	4 避光)
3b酶结合物稀释液	1 瓶	1 瓶	4 °C
4浓缩洗涤液 20×	1 瓶	1 瓶	4 °C
显色剂	1 瓶	1 瓶	4 避光)
终止液	1 瓶	1 瓶	4 °C
抗体包被板条	8×6	8×12	4 °C
封板胶纸	2 张	4 张	4 °C
说明书	1 份	1 份	

【标本收集】

- 血清: 使用不含热原和内毒素的试管, 收集血液后, 室温凝血30min, 1000×g离心10min, 小心分离血清。
- 血浆: 用EDTA、柠檬酸盐、肝素作为抗凝剂收集血浆, 收集后30min内以1000×g离心15min去除颗粒。
- 细胞上清液: 1000×g离心10min去除颗粒和聚合物。
- 保存: 若样品不立即检测, 请将其按一次用量分装, -20 °C-70 °C 保存, 避免反复冻融。尽量避免使用溶血或高血脂样本。如果血清中含有大量颗粒, 检测前先离心或过滤去除; 室温下解冻, 请勿于37 °C 或更高的温度加热解冻。
- 稀释: 可根据实际情况, 将标本做适当倍数稀释(建议做预实验, 以确定稀释倍数)。

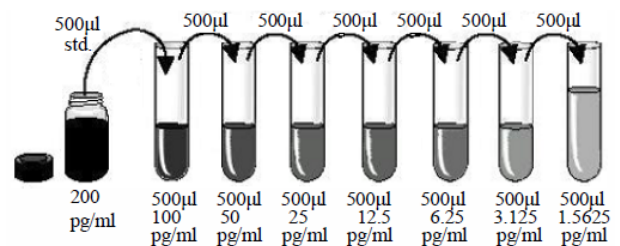
【使用方法】

检测前准备工作:

- 请提前30分钟从冰箱中取出试剂盒, 平衡至室温。
- 洗涤缓冲液: 从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶, 这属于正常现象, 加热并轻轻摇晃使结晶完全溶解后再配制。将浓缩洗涤液用双蒸水稀释(1:20)。未用完的放回4 °C
- 标准品: 加入标准品/标本稀释液(1b)1.0ml至冻干标准品(1a)中, 待彻底溶解后, 静置15分钟混匀(浓度为200pg/ml), 然后根据需要进行稀释, 见下图(建议标准曲线使用以下浓度: 100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.5625、0 pg/ml)。

注: 稀释的标准品不得重复使用, 未用完的标准品应按照一次用量分装后, 将其放在-20~-70 °C 贮存, 一次性使用, 避免反复冻融。

标准品稀释方法图例



- 生物素化抗体工作液：根据每孔需要100 μ l来计算总的用量，多配制100-200 μ l。以生物素化抗体稀释液(2b)稀释浓缩生物素化抗(2a)(1:100)。最好现用现配。
- 酶结合物工作液：以酶结合物稀释液(3b) 稀释浓缩酶结合物(3a)(1:100)。最好现用现配。

操作步骤:

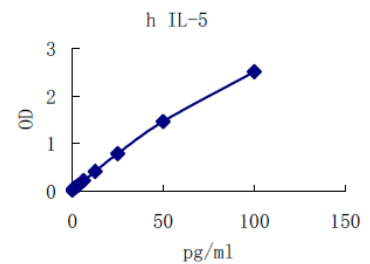
- 按照上述准备工作配制好各种溶液。
- 根据待测样品数量和标准品的数量决定所需的板条数，并增加1孔作为空白对照孔。分别将标本和不同浓度标准品(100 μ l /孔)加入相应孔中（零孔只加标准品/样本稀释液），用封板胶纸封住反应孔，37 $^{\circ}$ C 孵箱孵育90分钟（空白对照孔除外）。
- 洗板4次：(1)自动洗板机：要求注入的洗涤液为350 μ l，注入与吸出间隔15-30秒。(2)手工洗板：甩尽孔内液体，每孔加洗涤液350 μ l，静置30秒后用尽液体，在厚透吸水纸上拍干。
- 加入生物素化抗体工作液(100 μ l /孔)。用封板胶纸封住反应孔，37 $^{\circ}$ C 孵箱孵育60分钟（空白对照孔除外）。
- 洗板4次。
- 加入酶结合物工作液(100 μ l /孔)。用封板胶纸封住反应孔，37 $^{\circ}$ C 孵箱孵育30分钟（空白对照孔除外）。
- 洗板4次。
- 加入显色剂100 μ l /孔，避光，37 $^{\circ}$ C 孵箱孵育10-20分钟。
- 加入终止液100 μ l /孔，混匀后即刻测量OD450值(5分钟内)。

结果判读:

- 每个标准品和标本的OD值应减去零孔的OD值。（若不减零孔值，标准曲线的零孔应相交于Y轴）
- 使用计算机软件以标准品浓度为横坐标，OD值为纵坐标，生成相应的标准曲线。通过标本的OD值可在标准曲线上换算出其浓度。
- 若OD值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测，计算浓度时应乘以稀释倍数。

【灵敏度，特异性和重复性】

- 灵敏度：最低检测人IL-5剂量小于0.8pg/ml。
- 特异性：不与EGF,G-CSF, IFN- γ , IL-2,3,6,8,10,TNF- α 等反应。
- 重复性：板内、板间变异系数均<10%。



注：本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线计算标本含量。

【注意事项】

- 试剂盒使用前请保存在2-8 $^{\circ}$ C。除复溶后的标准品，其他成分不可冻结。
- 浓缩生物素化抗体，浓缩酶结合物体积小，运输中颠簸和可能的倒置，会使液体沾到管壁或瓶盖。因此使用前请用手甩几下或1000 rpm离心1分钟，以使附着管壁或瓶盖的液体沉积到管底。
- 从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶,属于正常现象，微加热至40 $^{\circ}$ C使结晶完全溶解后再配制洗涤液。
- 若需要分次使用标准品，在标准品复溶后应按每一次用量分装，将其放在-20或-70 $^{\circ}$ C贮存。避免反复冻融。
- 使用干净的塑料容器配制洗涤液，使用前充分混匀试剂盒里的各种成份及样品。
- 洗涤酶标板时应充分拍干，不要将吸水纸直接放入酶标反应孔中吸水。
- 不要用其它来源的试剂混合或替代该产品的组分，不同批号的试剂盒组份不能混用，请在有效期内使用本产品。
- 在试验中标准品和样本检测时建议作双复孔或三复孔，加入试剂的顺序应一致，以保证所有反应孔孵育的时间一样。
- 充分混匀对反应结果尤为重要，最好使用微量振荡器(使用最低频率进行振荡)。
- 避免操作过程中酶标板干燥，干燥会使酶标板上生物成分迅速失活，影响实验结果。
- 适当的稀释样品，使样品值落在标准曲线范围内，根据待测因子含量高、中、低的不同，建议采用1:100、1:10、1:2稀释样品。
- 如果样品OD值高于最高标准，适当增加稀释度并重复检测。
- 标准品稀释液，操作人，移液方式，洗涤方法，孵育时间及温度，试剂盒批次的不同均可能会导致结果的差异。
- 此法可有效的消除可溶性受体、结合蛋白以及生物样品中的其他因素的干扰。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。在所有情况下，本公司对此产品所承担的责任，仅限于此产品的价值本身。