

Human IL-6 Uncoated ELISA Kit

Catalog NO.:RK04266

version: 2.0

*使用前，请务必阅读产品包装内说明书

产品简介

本试剂盒产品使用夹心法定量测定人血清、血浆和细胞培养上清中 IL-6 的含量。产品稀释液可能适用于大多数细胞上清、血清和血浆样本。

试剂盒组分及保存条件

未拆封的试剂盒最多可于 2-8°C 保存 2 周，若需长期保存，请按照以下条件分别保存各组分。已拆封的产品须在 1 个月内使用完；不建议使用过期产品。

组分	规格			浓度	试剂保存
	5set	15set	20set		
人IL-6 包被抗体 Human IL-6 Capture Antibody	1×200ul	1×600 μL	1×800ul	1 mg/mL	最多可于-20 度保 存 6 个月
人IL-6 检测抗体 Human IL-6 Biotin-Conjugate Antibody	1×100ul	1×300 μL	1×400ul	250 μg/mL	最多可于-20 度保 存 6 个月
人 IL-6 冻干标准品 Human IL-6 Standard Lyophilized	1× 2ng/vial	1×2ng/vial	2×2ng/vial	/	最多可于-20 度保 存 6 个月
链霉亲和素 HRP (200x) Streptavidin-HRP Concentrated (200x)	1×350ul	1×1000 μL	2×700ul	/	最多可于 2-8 度保 存 6 个月，不要冰 冻
说明书 Specification	1				

其他所需的试剂

组装试剂 (1 set)

组分	规格	货号	试剂保存
酶标板uncoated plate	1 x 96T	RM01758	最多可于室温保存 6 个月
包被液 Coating Buffer	1 x 20 mL	RM01756	最多可于 2-8 度保存 6 个月
封闭液 Blocking Buffer	1 x 20 mL	RM01757	最多可于 2-8 度保存 6 个月
标准品/样本稀释液 Standard/Sample Diluent	1 x 20 mL	RM00023	最多可于 2-8 度保存 6 个月
检测抗体稀释液 Biotin-Conjugate Antibody Diluent	1 x 12 mL	RM00024	最多可于 2-8 度保存 6 个月
链霉亲和素 HRP 稀释液 Streptavidin-HRP Diluent	2 x 12 mL	RM00025	最多可于 2-8 度保存 6 个月
洗涤液(20x) Wash Buffer(20x)	1 x 30 mL	RM00026	最多可于 2-8 度保存 6 个月
显色剂 TMB Substrate	1 x 12 mL	RM00027	最多可于 2-8 度保存 6 个月
终止液 Stop Solution	1 x 6 mL	RM00028	最多可于 2-8 度保存 6 个月
封板膜Plate Sealers	4 x 1pcs	RM01759	最多可于室温保存 6 个月

1. 建议使用超纯水稀释洗涤液(20x)。

上述一些组分可以单独配制：

包被液 (PBS) : 37 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.2-7.4,
0.2 μm 过滤。

封闭液：1% BSA, 5% sucrose in PBS, pH 7.2-7.4, 0.2 μm 过滤。

标准品/样本稀释液、检测抗体稀释液、链霉亲和素 HRP 稀释液：1% BSA in PBS, pH 7.2-7.4, 0.2 μm 过滤。

洗涤液：0.05% Tween® 20 in PBS, pH 7.2-7.4 。

显色剂：试剂 A (H_2O_2) 和试剂 B (四甲基联苯胺) 以 1: 1 比例混合。

终止液：1 N HCL。

实验所需的材料

1. 酶标仪，并配置主波长 450nm，次波长 630nm 或 570nm。
2. 单/多通道移液器及吸头。
3. 去离子水或蒸馏水。
4. 洗瓶或是自动洗板机。
5. 恒温箱。
6. 灭菌的试管或是 EP 管，用于样本或是标准蛋白的稀释。

重要提示

***本产品仅用于科研，不能用于临床诊断。**

1. 请留意产品标签上的有效期时间，并在有效期前使用本产品。
2. 请勿将不同批次或者来自不同厂家的试剂混合使用。
3. 实验过程中的加样、洗板、孵育时间、孵育温度等操作均会对最终结果造成影响，请严格管理实验流程并做好记录。

4. 样本的收集、处理及保存均会对检测结果产生影响，请务必严格管理样本的处理过程。
5. 在本试验中对所有因素进行试验之前，不能排除干扰的可能性。
6. 相关试剂中可能存在有害物质，使用中请注意佩戴手套，必要时佩戴护目镜。
7. 为保证最佳检测效果，相关试剂组分的保存请参照标签或是说明书。
8. 试剂配制后的混匀对检测结果非常重要，但部分蛋白或是抗体可能对剧烈的涡旋非常敏感，可能造成活性损失，请谨慎使用涡旋。
9. 请使用灭菌的耗材进行试剂配制，以免造成试剂污染，影响最终检测结果。
10. 为保证最佳检测效果，溶解后的标准蛋白及相关试剂的工作液不建议冻存后重复使用。
11. 产品在储存或是使用中，请注意避光。
12. 为保证最佳检测效果，在加不同样本时，请注意更换吸头。
13. 请严格按照说明书的要求进行试剂配制。如果您将分次使用试剂盒，请使用封口袋密封好预包被板，并且在开封后的1个月内使用完。

样本收集与保存

1. 细胞培养上清：

1000 xg 离心 10 分钟，及时检测；或将样本置于-20 至-70℃中分装保存（24 小时内检测可置于 2-8℃），避免反复冻融。如果细胞培养上清样本的稀释度比较大，可先用培养基进行中间的稀释，最后用标准品/样本稀释液(R1)稀释。

2. 血清：

使用血清分离管，分离血清前让样品凝结 30 分钟，1000 xg 离心 10 分钟并及时检测；或将样本置于-20℃至-70℃中分装保存（24 小时内检测可置于 2-8℃），避免反复冻融。

3. 血浆：

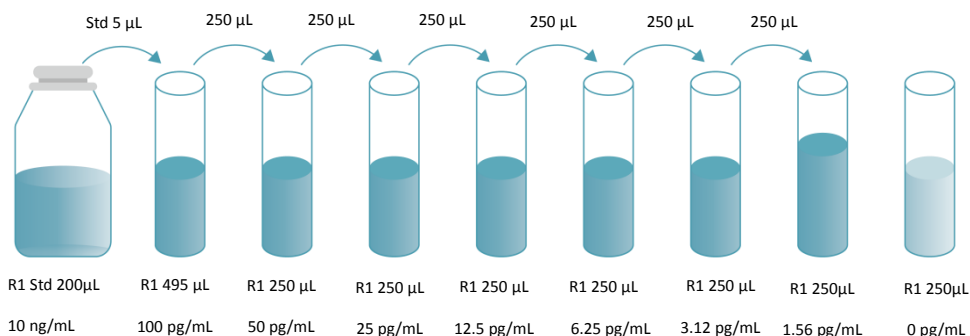
收集血浆时用 EDTA 或肝素作为抗凝剂，在 30 分钟内 1000 xg 离心 15 分钟收集样本，及时检测；或将样本置于-20℃至-70℃中分装保存（24 小时内检测可置于 2-8℃），避

免反复冻融。

4. 避免使用溶血、高血脂血清/血浆样本。

试剂准备

- 使用前将所需使用的试剂平衡至室温。如果浓缩液中有结晶析出，需要将试剂置于室温轻轻摇动，直至晶体完全溶解。
- 包被抗体：建议使用包被液包被，浓度定为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；向酶标板中每孔加入 100 μL 配制的包被抗体。4 度过夜孵育。甩去板孔中液体，向每孔中加入 200 μL 封闭液。37 度孵育 2 小时。甩去板孔中液体，向每孔中加入 350 μL 洗涤液，40 秒后再次甩去板孔中液体，此步骤重复 2 次，共计操作 3 次。
- 标准品：向冻干品中加入 0.2 mL 的标准品/样品稀释液，轻轻混匀至少 15min，使冻干品完全溶解至浓度为 10 ng/mL 。按照下图准备好包含 R1 稀释液的 EP 管，并按照提示进行梯度稀释（建议标准曲线使用以下浓度：100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0 pg/mL ）。复溶标准品原液（10 ng/mL ）。准备好标准品在 20 分钟内使用。剩余标准品分装并保存在 -20 至 -70 $^{\circ}\text{C}$ 。



4. 检测抗体：建议使用检测抗体稀释液稀释 500 倍后使用。注意：稀释后的工作液应在 30

分钟内使用。

5. 浓缩链霉亲和素-HRP (200x)：建议在使用前用链霉亲和素-HRP 稀释液将浓缩链霉亲和素-HRP 以 1：200 的比例稀释。注意：稀释后的工作液应在 30 分钟内使用。

实验步骤

为获得理想的实验结果，请注意，所需使用的试剂在使用前平衡到室温。

1. 按照上述步骤提前准备好所有试剂、即用标准品、样品。
2. 在空白孔中添加 100 μL 标准品/样品稀释液。
3. 在其他孔中分别加入 100 μL 不同浓度的标准品或样品，用提供的封板膜封闭板孔，37°C 孵育 2 小时。
4. 在使用前 15 分钟配制好检测抗体工作液。
5. 弃去孔中液体，每孔加入 1x 洗涤缓冲液 350 μL ，静置 40 秒后弃去液体，该步骤共洗涤 3 次。
6. 每孔中加入检测抗体工作液（100 μL /孔），并盖上新的封板膜，37°C 下孵育 1 小时。
7. 使用前 15 分钟配制好链霉亲和素-HRP（200X）的工作液。
8. 弃去孔中液体，重复步骤 5 中的洗涤步骤。
9. 每孔中加入链霉亲和素-HRP 工作液（100 μL /孔），并盖上新的封板膜，37°C 孵育 30 分钟。
10. 预热酶标仪。
11. 弃去孔中液体，重复步骤 5 中的洗涤步骤。
12. 向孔中加入 TMB 底物（100 μL /孔）。在 37°C 下避光孵育 15-20 分钟。
13. 加入终止液（50 μL /孔），并立即放入酶标仪，在 5min 内测定每个孔 450nm 的 OD 值。如果可以选择校正波长，则设置为 570 nm 或 630 nm。并从 450 nm 的读数中减去 570 nm 或 630 nm 的读数，这种方式可以校正并去除非显色物质的 OD 值，从而获得更准确的检测结果。如果无法选择校正波长，则获得的读数将偏高，导致读数的准确度下降。

简要实验流程

准备好需要的标准品和试剂



向孔中加入 100 μL 标准品或待测样本

37°C 孵育 2 小时, 然后洗板 3 次



每孔加 100 μL 检测抗体工作液

37°C 孵育 1 小时, 然后洗板 3 次



每孔加 100 μL 链霉亲和素-HRP 工作液

37°C 孵育 0.5 小时, 然后洗板 3 次



加入 100 μL 底物溶液

37°C 避光, 孵育 15-20 分钟



加入 50 μL 终止液



5min 内检测 450nm 波长的 OD 值

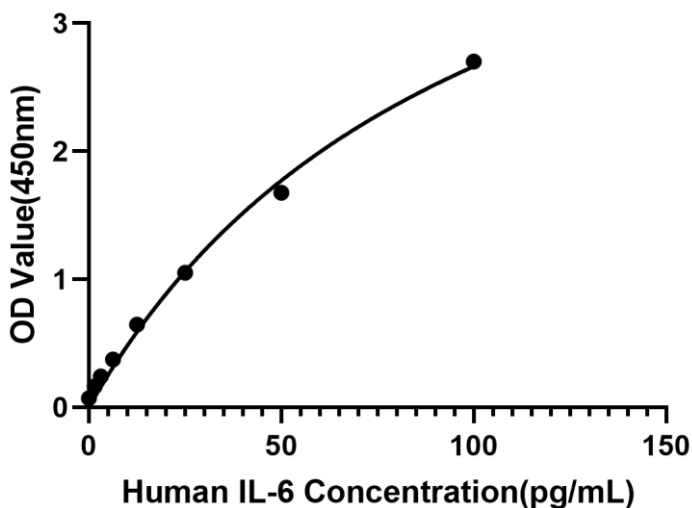
校正波长设置为 570nm 或 630nm

结果计算

1. 计算标准蛋白各浓度、质控、样本等复孔的平均 OD 值，每个测试的 OD 值都应减去空白孔的 OD 值以及次波长的 OD 值；
2. 使用测试获得的 OD 值绘制标准曲线，推荐使用 4-PL 拟合，具体也可根据需求选择其他拟合方式来绘制标准曲线。使用计算机软件以吸光度 OD 值为纵坐标 (Y)，相应的 IL-6 标准品浓度为横坐标 (X)，绘制标准曲线。样品的含量可根据其 OD 值由标准曲线计算出相应的浓度。
3. 如果样本在上样检测时进行了稀释，那么计算获得浓度需要乘以相应的稀释倍数。

典型数据

此标准曲线图仅供参考，计算实验结果请以实际实验数据进行。



特异性

本试剂盒可用于检测重组/天然人 IL-6。

以 10ng/mL 平行做特异性试验，未见发生交叉反应。

ELISA 常见问题分析及解决方法

问题描述	可能原因	解决方法
高背景值	洗板不充分	按要求充分洗涤，保证洗版时间、次数及每孔加样量无误
	孵育条件不正确	检查孵育时间、温度是否按要求进行
	试剂、样本的交叉污染	注意实验过程中可能造成样本交叉污染的操作； 配制新鲜的试剂，重复测试
无信号值或过低的信号值	试剂配制和使用错误	检查试剂配制浓度是否正确，是否按照顺序使用
	酶标仪使用、设置不正确	提前预热；设置正确的主、次波长读数
	显色时间过短	最佳显色时间应控制在 15-25min
	终止后，未及时读数	加入终止液后，在 5min 内读数
	样本基质效应	使用阳性质控品对照测试

过强的信号值	TMB 底物变质	检查 TMB 底物是否变蓝, 使用新的底物试剂
		避免使用金属物质接触底物造成变质失效
	每步实验未更换新的封板模	每步实验更换新的封板模
	样本中目标蛋白量过高	预测试, 选择适当是稀释倍数测试
重复性差	加样量不均一	检查移液器, 定期校准
	样本有杂质或沉淀物	样本使用前, 请按离心样本
	试剂配制未充分混匀	加样前充分混匀试剂

*For research purposes only. Not for therapeutic or diagnostic purposes.