

大鼠IL-2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: KE20002

规格: 96T

灵敏度: 8.3 pg/mL

检测范围: 31.25-2000 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大鼠IL-2浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

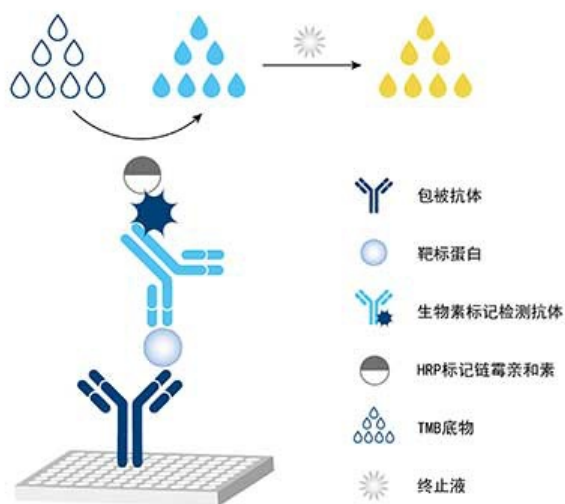
目录

| | |
|------------|---|
| 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 | 8 |

一：背景信息

白细胞介素-2(IL2)是一种最初被鉴定为T细胞生长因子的蛋白质。IL2主要由活化的CD4 + CD25-(辅助) T细胞产生,并诱导这些细胞和CD8 + T细胞、B细胞和NK细胞的增殖。因此它已经被用来治疗免疫缺陷如艾滋病,并诱导对肿瘤的免疫反应。IL2也被证明是CD4 + CD25 + 调节性T细胞的主要生长因子。白细胞介素2通过白细胞介素2受体(IL2R)介导其在靶细胞中的功能。IL2R是一种多聚功能蛋白,由三条不同的链组成:IL2R α 、IL2R β 和 γ_c 。

二：检测原理



◀双抗夹心模式图 (检测抗体标记生物素)

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 * | 2000 pg/瓶 | 2 瓶 |
| Detection antibody, biotinylated (100×) | 生物素标记检测抗体浓缩液 (100×) ** | 120 μL/支 | 1 支 |
| Streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) (100×) | HRP标记链霉亲和素浓缩液 (100×) ** | 120 μL/支 | 1 支 |
| Sample Diluent PT 1-ec | 样本稀释液 PT 1-ec | 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 |

储存条件：
1：未开启试剂盒可在2-8°C条件下存放6个月或者在-20°C条件下存放1年
2：已开启试剂盒可在2-8°C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°C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°C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°C存放，避免反复冻融。

七：试剂准备

7.1 洗涤液 (1×)：

如果洗涤液 (20x) 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 (20x), 加入570 mL 超纯水或去离子水, 得到1×洗涤液。

7.2 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检测抗体浓缩液 (100x) 加 990 μL 抗体稀释液进行配制, 轻轻混匀。

7.3 HRP标记链霉亲和素 (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标记的链霉亲和素浓缩液 (100x) 加 990 μL 抗体稀释液进行配制, 轻轻混匀。

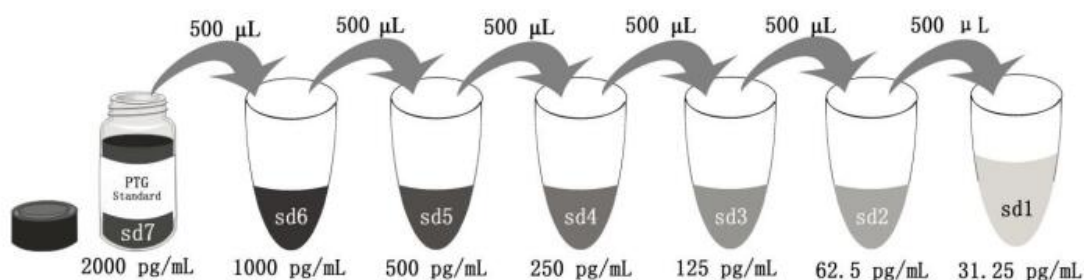
7.4 待检测样本：

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: 大鼠血清和细胞上清1:2或1:4稀释; 样品采集、处理和储存的差异可能导致测值的改变。

7.5 梯度稀释的标准品：

使用1 mL PT 1-ec 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 | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL |
| # μL of Sample Diluent PT 1-ec | 1000 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL |
| | "sd7" | "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(检测抗体浓缩液、HRP标记链霉亲和素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 加样,分别设零孔、标准孔、待测样本孔。零孔加样本稀释液100 μL,余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本100 μL/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);

8.3 酶标板盖上覆膜,37°C孵育2 h;

8.4 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×)洗涤板条,每孔350-400 μL,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;

8.5 每孔加100 μL 检测抗体(1×)(参照试剂准备部分7.2),盖上封板膜,37°C孵育1 h;

8.6 重复步骤8.4;

8.7 每孔加100 μL HRP标记链霉亲和素(1×)(参照试剂准备部分7.3),盖上封板膜,37°C孵育40 min;

8.8 重复步骤8.4;

8.9 显色:每孔加TMB显色液100 μL,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);

8.10 终止:每孔加终止液100 μL,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)

8.11 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;

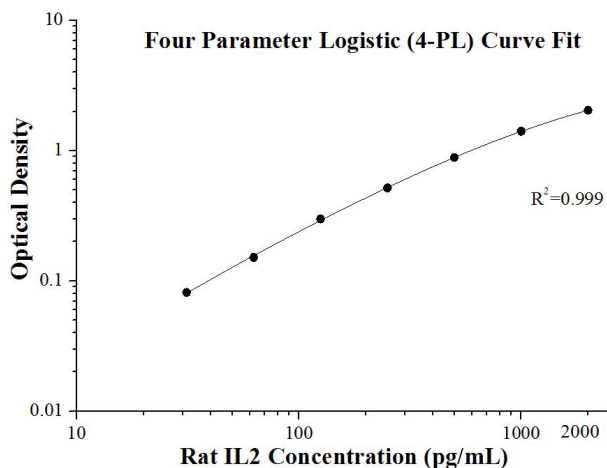
8.12 数据分析:每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值,设置复孔,取其平均值。以标准品的浓度为横坐标,OD 值为纵坐标,使用专业软件(如Origin、ELISACalc等)进行四参数拟合(4-PL),根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度,乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

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 | 标准品或样本 | 100 μL | 120 分钟 | 4 次 | 覆膜后37°C孵育 |
| 2 | 检测抗体(1×) | 100 μL | 60 分钟 | 4 次 | 覆膜后37°C孵育 |
| 3 | HRP标记链霉亲和素(1×) | 100 μL | 40 分钟 | 4 次 | 覆膜后37°C孵育 |
| 4 | 显色 TMB | 100 μL | 15-20 分钟 | 不需要洗涤 | 覆膜后37°C孵育,避光 |
| 5 | 终止液 | 100 μL | 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 | 0.086 0.074 | 0.08 | - |
| 31.25 | 0.166 0.157 | 0.162 | 0.082 |
| 62.5 | 0.232 0.231 | 0.232 | 0.152 |
| 125 | 0.369 0.389 | 0.379 | 0.299 |
| 250 | 0.599 0.596 | 0.598 | 0.518 |
| 500 | 0.972 0.958 | 0.965 | 0.885 |
| 1000 | 1.493 1.483 | 1.488 | 1.408 |
| 2000 | 2.177 2.065 | 2.121 | 2.041 |

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 | 38.4 | 2.4 | 6.2 |
| 2 | 20 | 219.4 | 9.8 | 4.5 |
| 3 | 20 | 1,013.1 | 62.1 | 6.1 |

| 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 | 37.0 | 2.3 | 6.2 |
| 2 | 24 | 225.5 | 17.2 | 7.6 |
| 3 | 24 | 996.8 | 84.6 | 8.5 |

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，进行大鼠IL-2的加标回收率实验，结果如下：

| 样本类型 | 稀释倍数 | 均值(%) | 范围(%) |
|------|------|-------|--------|
| 大鼠血清 | 1:2 | 95 | 83-114 |
| | 1:4 | 99 | 83-116 |
| 细胞上清 | 1:2 | 108 | 96-119 |
| | 1:4 | 104 | 93-117 |

9.4 样本值

应用本试剂盒，检测20份大鼠血清样本中大鼠IL-2的浓度。18例样品低于标曲最低点31.25 pg/mL，2例样本分别检出49.3 pg/mL和80.2 pg/mL。

大鼠在腹腔注射LPS (100 µg/kg)4小时后处死，采集血清，并检测大鼠IL-2的浓度为170 pg/mL。

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，此试剂盒中大鼠IL-2的灵敏度为8.3 pg/mL。

9.6 线性

大鼠血清和细胞上清加入高浓度的大鼠IL-2 蛋白，梯度稀释后检测样本加标线性，线性数据如下：

| 稀释倍数 | | 大鼠血清 | 细胞上清 |
|------|--------|---------|---------|
| 1:2 | 均值 (%) | 91 | 107 |
| | 范围 (%) | 89-93 | 94-111 |
| 1:4 | 均值 (%) | 102 | 96 |
| | 范围 (%) | 102-103 | 83-109 |
| 1:8 | 均值 (%) | 106 | 107 |
| | 范围 (%) | 102-108 | 100-114 |
| 1:16 | 均值 (%) | 105 | 100 |
| | 范围 (%) | 97-114 | 92-108 |

十：参考文献

1. Boyman O. et al. (2012). Nat Rev Immuno. 12:180-90.
2. N Engl J Med. et al. (1985). N Engl J Med. 313:1485-92.
3. Ahmadzadeh M. et al. (2006). Blood. 107: 2409-14.
4. Gaffen SL. Et al. (2004).Cytokine.28(3):109-23.