

# Rat IL-1 $\alpha$ ELISA 试剂盒

产品编号# CRE0015 (48/96 孔)

适用于人血清、血浆或细胞培养上清液等样本

仅供研究，不用于临床诊断。



客服热线: 400-7060-959 \* 技术支持邮箱: [tech@4abio.com](mailto:tech@4abio.com)  
公司官网: [www.4abio.net](http://www.4abio.net)

## 目录

|                              |        |
|------------------------------|--------|
| 简介 .....                     | - 3 -  |
| 检测原理 .....                   | - 3 -  |
| 试剂盒组分 .....                  | - 4 -  |
| 储存条件 .....                   | - 5 -  |
| 其他实验材料 (不提供, 但可协助购买) : ..... | - 5 -  |
| 注意事项 .....                   | - 5 -  |
| 样本收集处理及保存方法 .....            | - 6 -  |
| 试剂准备 .....                   | - 6 -  |
| 操作步骤 .....                   | - 8 -  |
| 操作流程图 .....                  | - 8 -  |
| 操作要点提示 .....                 | - 9 -  |
| 结果判断 .....                   | - 9 -  |
| 结果重复性 .....                  | - 10 - |
| 灵敏度 .....                    | - 10 - |
| 特异性 .....                    | - 10 - |
| 参考文献 .....                   | - 10 - |

 该产品由北京四正柏生物科技有限公司研制。

 请根据试剂盒中所附说明书指引进行实验。

## 简介

白介素-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ , 又名IL-1F1) 和IL-1 $\beta$  (IL-1F2)是细胞外分泌型信号多肽, 属于IL-1基因家族。IL-1 $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 结合到共同的细胞表面受体, 行使相同的生物学功能。这两个蛋白约有23%的氨基酸同源性, 均为31kDa大小的前体蛋白, 不含疏水信号肽。目前有证据显示IL-1不是通过典型途径分泌的。

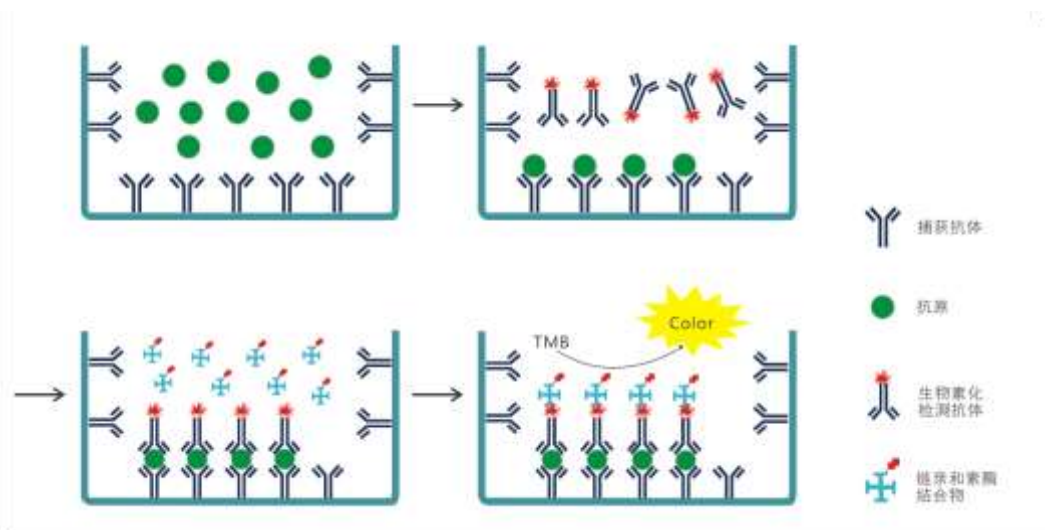
大鼠IL-1 $\alpha$ cDNA编码270个氨基酸的IL-1 $\alpha$ 前体。pro区长短为114个氨基酸, 含有一个核定位序列, 一个赖氨酸酰基化位点, 一个磷酸化位点和一个潜在的N-糖基化位点。成熟区为156个氨基酸, 不含有半胱氨酸和N糖基化位点。前体IL-1 $\alpha$ 在合成后定位于胞浆, 细胞活化后转移到细胞核并开始转录。也有一些IL-1 $\alpha$ 以膜结合的方式或者17kDa大小的循环分子被释放到胞外, 通过还不为熟知的细胞表面血凝素和糖基化IL-1 $\alpha$ 前体形式相互作用或者烷基化IL-1 $\alpha$ 前体和质膜磷脂之间的作用来结合到膜上。Calpain激活IL-1 $\alpha$ 前体, 以17kDa的可溶形式释放出来。不像IL-1 $\beta$ 前体那样没有生物学活性, 前体IL-1 $\alpha$ 和成熟IL-1 $\alpha$ 都有生物学活性。成熟后的蛋白中, 大鼠IL-1 $\alpha$ 和小鼠, 兔子, 人, 牛, canine and feline分别有79%, 60%, 59%, 58%, 57%, 和56%的氨基酸同源性。可表达IL-1 $\alpha$ 的哺乳动物细胞有褐色脂肪细胞, 角蛋白细胞, 单核细胞, 巨噬细胞, 内皮细胞和平滑肌细胞, 肥大细胞, 雪旺细胞, 成骨细胞和破骨细胞。

三个I型转膜免疫球蛋白超家族成员蛋白, IL-1 I型受体(IL-1 R1), IL-1 II型受体(IL-1 R2)和IL-1受体必须蛋白(IL-1 RAcP, IL-1 R3)均参与高亲和细胞表面IL-1受体复合物的形成。IL-1R1和IL-1 R2可直接和IL-1 $\alpha$ 结合。IL-1 RAcP不直接和IL-1 $\alpha$ 结合, 但是在IL-1的存在下和IL-1 R1作用形成高亲和力受体复合物, 此复合物是细胞内信号转导所需的。IL-1 RAcP和IL-1 R2作用形成的高亲和力受体复合物无生物功能, 不转导IL-1信号。然而, IL-1 R2可作为诱饵受体来削减IL-1 $\alpha$ 的功能。

IL-1 $\alpha$ 拥有广泛的生物学活性, 在介导免疫和炎症反应中起到重要作用。IL-1 $\alpha$ 的正常产生对于造血作用, 血管形成, 破骨细胞的分化, 受伤和感染的正常反应是至关重要的。

## 检测原理

本实验采用双抗体夹心 ELISA。用抗大鼠 IL-1 $\alpha$  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-1 $\alpha$  会与其单抗结合, 洗去游离成分; 加入生物素化的抗大鼠 IL-1 $\alpha$  抗体, 抗大鼠 IL-1 $\alpha$  抗体与结合在单抗上的大鼠 IL-1 $\alpha$  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-1 $\alpha$ , 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-1 $\alpha$  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-1 $\alpha$  浓度。



检测原理示意图

## 试剂盒组分

| 试剂盒组分          | 96 孔 | 48 孔 | 配制        |
|----------------|------|------|-----------|
| 1a 标准品         | 2 支  | 1 支  | 按说明书进行稀释  |
| 1b 标准品和标本稀释液   | 1 瓶  | 1 瓶  | 即用型       |
| 2a 浓缩生物素化抗体    | 2 支  | 1 支  | 按瓶签标识进行稀释 |
| 2b 生物素化抗体稀释液   | 1 瓶  | 1 瓶  | 即用型       |
| 3a 浓缩酶结合物 (避光) | 2 支  | 1 支  | 按瓶签标识进行稀释 |
| 3b 酶结合物稀释液     | 1 瓶  | 1 瓶  | 即用型       |
| 4 浓缩洗涤液 20×    | 1 瓶  | 1 瓶  | 按瓶签标识进行稀释 |
| 显色剂 (避光)       | 1 瓶  | 1 瓶  | 即用型       |
| 终止液            | 1 瓶  | 1 瓶  | 即用型       |
| 抗体包被板条         | 8×12 | 8×6  | 即用型       |
| 封板胶纸           | 4 张  | 2 张  | 即用型       |
| 说明书            | 1 份  | 1 份  |           |

如果您收到试剂盒后发现上表中有任何组分破损或缺失,请及时联系我司客服 400-7060-959 或 [tech@4abio.com](mailto:tech@4abio.com)。我们将及时为您解决相关问题。

## 储存条件

|             |                              |  |
|-------------|------------------------------|--|
| 未启封的试剂盒     | 4℃保存，请于保质期内使用。               |  |
| 已启封或重新溶解的试剂 | 1b 标准品和标本稀释液                 | 可以整盒放入 4℃储存 1 个月。<br>2a 浓缩生物素化抗体和 3a 浓缩酶结合物需用现配。 |
|             | 2a 浓缩生物素化抗体 (100×)           |  |
|             | 2b 生物素化抗体稀释液                 |  |
|             | 3a 浓缩酶结合物 (避光 100×)          |  |
|             | 3b 酶结合物稀释液                   |  |
|             | 4 浓缩洗涤液 20×                  |  |
|             | 显色剂 (避光)                     |  |
|             | 终止液                          | 4℃或常温保存  |
|             | 标准品                          | 重溶后分装，-20℃存放一个月，避免反复冻融。稀释后的标准品使用后应丢弃，不得重复使用。     |
| 抗体包被板条      | 实验中不用的板条应立即放回包装袋中，密封干燥 4℃保存。 |  |

以上储存条件均要求在试剂盒保质期内。

## 其他实验材料 (不提供, 但可协助购买):

1. 酶标仪(450nm)
2. 高精度可调移液器及吸头: 0.5-10, 2-20, 20-200, 200-1000 $\mu$ l; 一次检测样品较多时, 最好用多通道移液器。
3. 自动洗板机或洗瓶
4. 37℃温箱
5. 双蒸水或去离子水
6. 坐标纸
7. 量筒

## 注意事项

1. 试剂盒保存在2-8℃, 除复溶后的标准品, 其它成分不可冷冻。
2. 浓缩生物素化抗体(2a)、浓缩酶结合物(3a)装量极少, 运输中颠簸和可能的倒置会使液体沾到管壁或瓶盖。使用前请离心处理以使附着于管壁或瓶盖的液体沉积到管底。
3. 为避免交叉污染请使用一次性吸头。
4. 终止液和显色剂具腐蚀性, 避免皮肤及粘膜直接接触, 一旦接触到这些液体, 请尽快用大量水冲洗。
5. 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。
6. 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。
7. 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, 请在有效日期内使用本产品。

8. 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。
9. 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)。
10. 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。
11. 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。
12. 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。
13. 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。

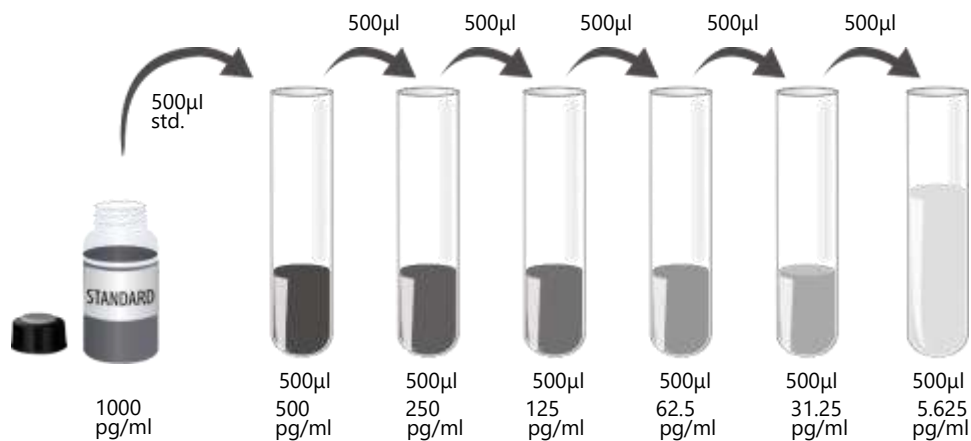
## 样本收集处理及保存方法

1. **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。
2. **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。
3. **细胞上清液**：1000×g离心10min去除颗粒和聚合物。
4. **保存**：若样品不立即检测，请将其按一次用量分装，-20℃—70℃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℃或更高的温度加热解冻。
5. **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)。  
**注：正常猪血清或血浆样本建议做1:2稀释。**

## 试剂准备

1. 提前30min从冰箱中取出试剂盒，平衡至室温。
2. **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℃。
3. **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1000pg/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：1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625、0 pg/ml)。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℃贮存，一次性使用，避免反复冻融。

标准品稀释方法：



4. **生物素化抗体工作液：**根据每孔需要50µl来计算总的用量，多配制50-100µl。以生物素化抗体稀释液(2b)稀释浓缩生物素化抗体(2a)(1:100)。最好现用现配。（稀释方法见下表）

| 所用板条数 | 浓缩生物素化抗体 | + | 生物素化抗体稀释液 |
|-------|----------|---|-----------|
| 12    | 55µL     | + | 5545µL    |
| 10    | 45µL     | + | 4455µL    |
| 8     | 35µL     | + | 3465µL    |
| 6     | 25µL     | + | 2475µL    |
| 4     | 17µL     | + | 1683µL    |
| 2     | 9µL      | + | 891µL     |
| 1     | 4.5µL    | + | 444.5µL   |

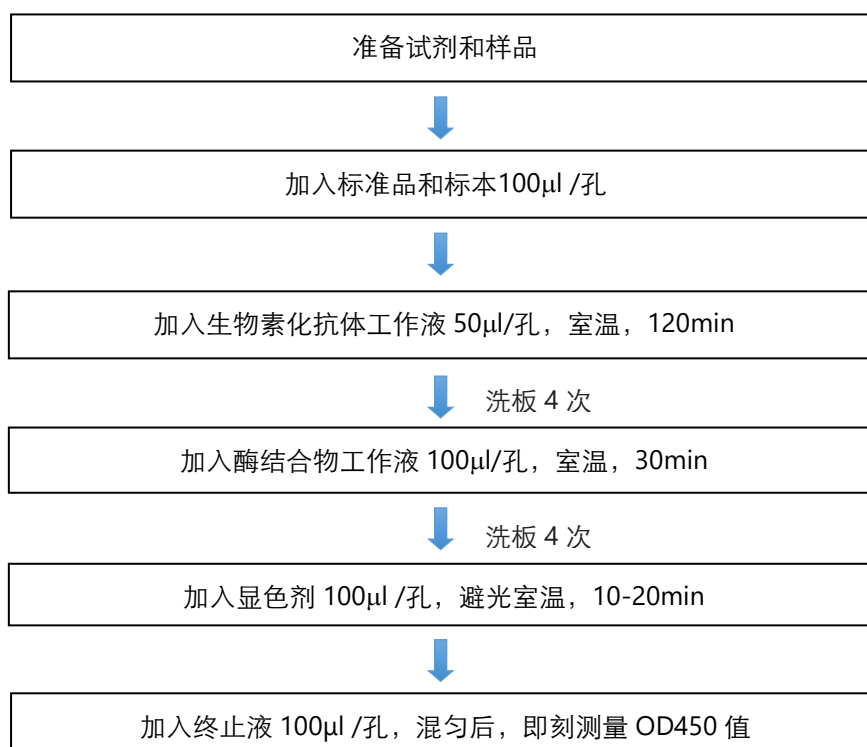
5. **酶结合物工作液：**以酶结合物稀释液(3b) 稀释浓缩酶结合物(3a)(1:100)。最好现用现配。（稀释方法见下表）

| 所用板条数 | 浓缩酶结合物 | + | 酶结合物稀释液 |
|-------|--------|---|---------|
| 12    | 110µL  | + | 10890µL |
| 10    | 90µL   | + | 8910µL  |
| 8     | 70µL   | + | 6930µL  |
| 6     | 50µL   | + | 4950µL  |
| 4     | 33µL   | + | 3267µL  |
| 2     | 17µL   | + | 1683µL  |
| 1     | 9µL    | + | 891µL   |

## 操作步骤

1. 按照上述准备工作配制好各种溶液。
2. 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 $\mu$ l /孔)加入相应孔中，加入生物素化抗体工作液(50 $\mu$ L/孔)（零孔只加标准品/样本稀释液）。用封板胶纸封住反应孔，室温孵育120分钟（空白对照孔除外）。充分混匀对反应结果尤为重要，要使用微量振荡器（最低频率700rpm）。
3. 洗板4次：(1)自动洗板机：要求注入的洗涤液为350 $\mu$ 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 $\mu$ l，静置30秒后甩尽液体，在厚透吸水纸上拍干。
4. 加入酶结合物工作液(100 $\mu$ l /孔)。用封板胶纸封住反应孔，室温孵育30分钟（空白对照孔除外）。使用微量振荡器(使用最低频率700rpm)。
5. 洗板4次。
6. 加入显色剂100 $\mu$ l /孔，避光，室温孵育10-20分钟。
7. 加入终止液100 $\mu$ l /孔，混匀后即刻测量OD450值(5分钟内)。

## 操作流程





## 操作要点提示

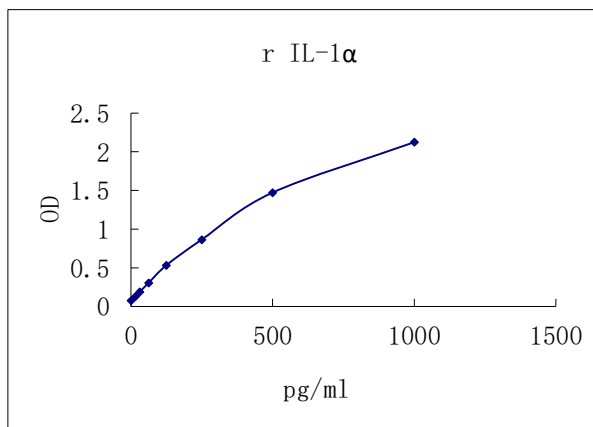
1. 配制各种试剂时要充分混匀，但要避免产生大量泡沫，以免加样时加入大量的气泡，产生加样误差。
2. 为避免交叉污染，在加入不同浓度的标准品、不同样品、不同试剂时谨记及时更换吸头。
3. 为了确保准确的结果，在每次孵育前均需使用新封板胶纸封住反应孔。
4. 显色剂在添加之前，应保持无色，请勿使用已变为蓝色的显色溶液。最佳显色时间对标准曲线很重要，肉眼可见前 3-4 孔有梯度蓝色，后 3-4 孔差别不明显，零孔无蓝色出现即可终止。
5. 每次检测均要做标准曲线，根据样品待测因子的含量，适当稀释或浓缩样本，最好做预实验。

## 结果判断

1. 每个标准品和标本的OD值应减去空白孔的OD值，如果做复孔，求其平均值。
2. 使用计算机软件以吸光度OD值为纵坐标(Y)，相应的标准品浓度为横坐标(X)，生成相应的标准曲线，样品待检物含量可根据其OD值由标准曲线换算出相应的浓度。
3. 若标本 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算标本含量。
4. 参考数据：

| 标准品浓度(pg/ml) | OD值1  | OD值2  | 平均值   | 矫正值   |
|--------------|-------|-------|-------|-------|
| 0            | 0.075 | 0.073 | 0.074 | —     |
| 15.625       | 0.132 | 0.128 | 0.130 | 0.133 |
| 31.25        | 0.190 | 0.200 | 0.195 | 0.190 |
| 62.5         | 0.306 | 0.310 | 0.308 | 0.305 |
| 125          | 0.533 | 0.535 | 0.534 | 0.521 |
| 250          | 0.865 | 0.869 | 0.867 | 0.895 |
| 500          | 1.473 | 1.471 | 1.472 | 1.454 |
| 1000         | 2.124 | 2.128 | 2.126 | 2.130 |

数据仅供参考，不同用户最佳显色时间会有所不同



本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线为准

## 结果重复性

板间，板内变异系数均<10%。

## 灵敏度

最低检测大鼠 IL-1 $\alpha$  剂量小于 7pg/ml。最低检出量测定方法：20 个零标准的平均 OD 值增加两个标准差，再计算相应的浓度。

## 特异性

此试剂盒可检测天然和重组的大鼠 IL-1 $\alpha$ ，以 50ng/ml 平行做特异性试验，均不与下列细胞因子及蛋白反应。

| 重组人细胞因子                    | 重组小鼠细胞因子                   | 其他蛋白          |
|----------------------------|----------------------------|---------------|
| EC-VEGF/PK1                | PlGF-2                     | CINC-1        |
| PDGF-AA                    | VEGF120                    | CINC-2        |
| PDGF-AB                    | VEGF164                    | CINC-3        |
| PDGF-BB                    | VEGF-D                     | E-selectin/Fc |
| PlGF                       | VEGF R2(KDR)/Fc Chimera    |               |
| VEGF-B167                  | VEGF R3(Flt-4) /Fc Chimera |               |
| VEGF-C                     |                            |               |
| VEGF-D                     |                            |               |
| VEGF R3(Flt-4) /Fc Chimera |                            |               |

## 参考文献

1. Arend, W.P. (2002) Cytokine Growth Factor Rev. 13:323.
2. Sims, J.E. et al. (2001) Trends Immunol. 22:536.
3. Nickel, W. (2003) Eur. J. Biochem. 270:2109.
4. Dinarello, C.A. (1991) Blood 77:1627.
5. Nishida, T. et al. (1989) J. Biochem. 105 :351.
6. Wessendorf, J.H.M. et al. (1993) J. Biol. Chem. 268:22100.
7. Beuscher, H.U. et al. (1988) J. Biol. Chem. 263:4023.
8. Stevenson, F.T. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7245.

9. Werman, A. et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:2434.
10. Pollock, A.S. et al. (2003) FASEB J. 17:203.
11. Kaplanski, G. et al. (1994) Blood 84:4242.
12. Brody, D.T. and S.K. Durum (1989) J. Immunol. 143:1183.
13. Apte, R.N. and E. Voronov (2002) Semin. Cancer Biol. 12:277.
14. Kobayashi, Y. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:5548.