

Human IL-5 ELISA 试剂盒

产品编号# CHE0006 (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
公司官网: 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 | - 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

1980年 Takatsu 等发现在 T 细胞条件培养液中，含有一种因子能替代 T 细胞在体外协同胸腺依赖抗原的抗体应答，称为 T 细胞替代因子(T cell replacing factor, TRF)。由于这种因子对 B 细胞和嗜酸性粒细胞增殖、分化有重要调节作用，又名 B 细胞生长因子- II (B cell growth factor- II, BCGF- II), IgA 增强因子(IgA-enhancing factor, IgA-EF)，嗜酸性粒细胞集落刺激因子(eosinophil colony-stimulating factor, Eo-CSF)和嗜酸性粒细胞分化因子(eosinophil differentiation factor, EDF)。1986 年统一命名为白细胞介素-5 (interleukin 5, IL-5)。

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。

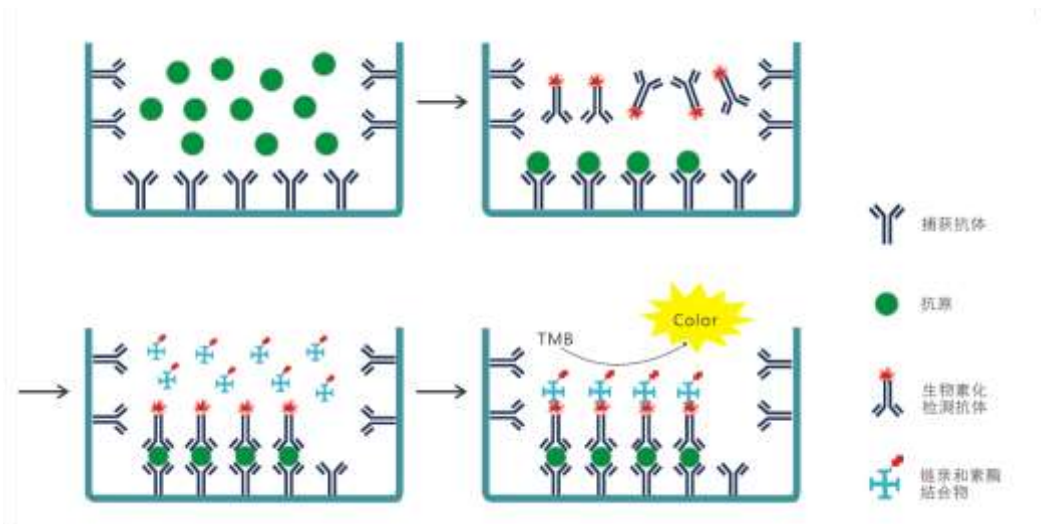
人的 IL-5 由 134 氨基酸残基组成，含 22 氨基酸残基信号肽，2 个糖基化点，人和小鼠 IL-5 基因分别定位于第 5 号和第 11 号染色体，与 IL-3、IL-4、GM-CSF 等造血因子的基因密切连锁。人和鼠 IL-5 在氨基酸水平上有 70% 的同源性，生物学作用有交叉反应。人和鼠 IL-5R α 链有 79% 的同源性。

与其它白细胞介素相比，IL-5 生物学活性作用谱相对较窄。其生物学作用如下：

- 1) 小鼠 IL-5 促进抗原刺激的 B 细胞分化为抗体合成细胞，主要作用于进入细胞增殖后期的 B 细胞，并增加活化 B 细胞 IL-2R 的表达，IL-5 的这种刺激作用与人 IL-6 功能相似，人 IL-5 只作用于 B 细胞刺激后很窄的时相内。
- 2) 促进 IgA 合成，其机理可能是：①作为 IgA 特异性启动因子，使 mIgM 阳性 B 细胞分化为 mIgA 阳性 B 细胞；②作用于 IgA 型 B 细胞，促进其增殖和分化，成为分泌 IgA 的浆细胞。IL-4 有协同 IL-5 促进 IgA 合成的作用。IL-5 对 IgM 的分泌也有促进作用。
- 3) 协同 ConA 或 IL-2 诱导胸腺中杀伤性 T 细胞前体(CTPp)分化为 CTL。
- 4) 趋化人嗜酸性粒细胞，延长成熟嗜酸性粒细胞的存活时间，刺激人和小鼠嗜酸性粒细胞的功能，诱导嗜酸性粒细胞的分化。

检测原理

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 会与其单抗结合，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。



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。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。 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 μ 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。

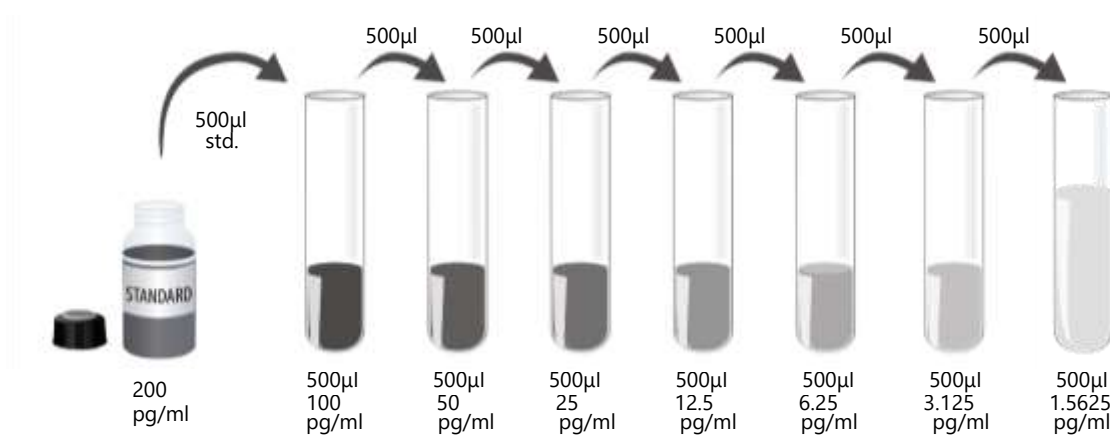
样本收集处理及保存方法

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：正常人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)。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100µl来计算总的用量，多配制100-200µl。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。（稀释方法参照下表）

| 所用板条数 | 浓缩生物素化抗体 | 生物素化抗体稀释液 |
|-------|----------|-----------|
| 12 | 110µL | + 10890µL |
| 10 | 90µL | + 8910µL |
| 8 | 70µL | + 6930µL |
| 6 | 50µL | + 4950µL |
| 4 | 33µL | + 3267µL |
| 2 | 17µL | + 1683µL |
| 1 | 9µL | + 891µL |

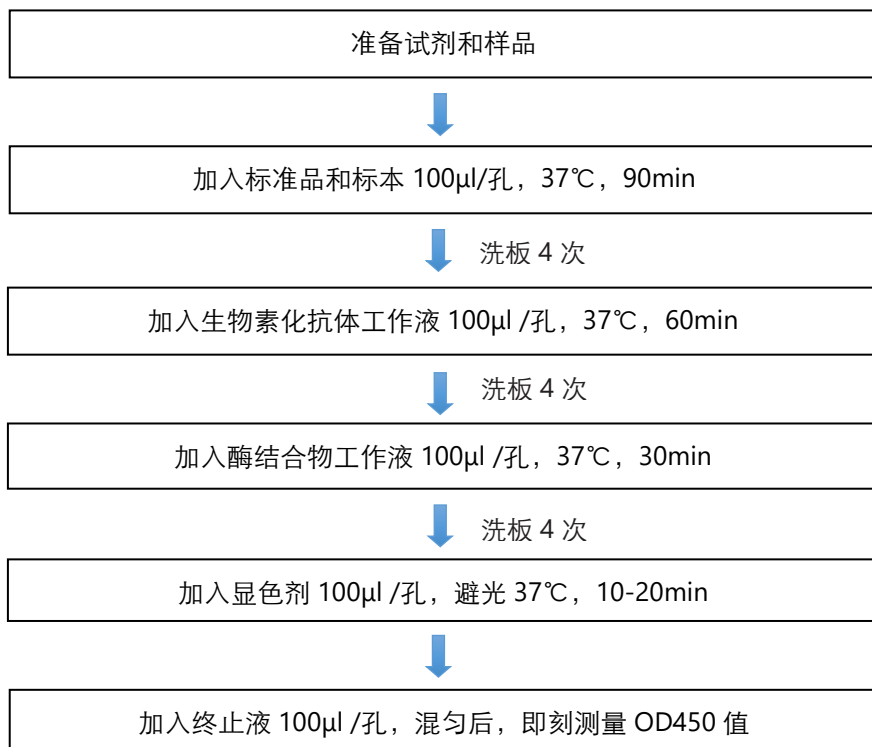
5. **酶结合物工作液：**以酶结合物稀释液(3b) 稀释浓缩酶结合物(3a)(1:100)。最好现用现配。（稀释方法参照下表）

| 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 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）。
3. 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秒后甩尽液体，在厚迭吸水纸上拍干。
4. 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)。
5. 洗板4次。
6. 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）。
7. 洗板4次。
8. 加入显色剂100 μ l /孔，避光，37 $^{\circ}$ C孵箱孵育10-20分钟。
9. 加入终止液100 μ l /孔，混匀后即刻测量OD450值(5分钟内)。

操作流程圖



操作要点提示

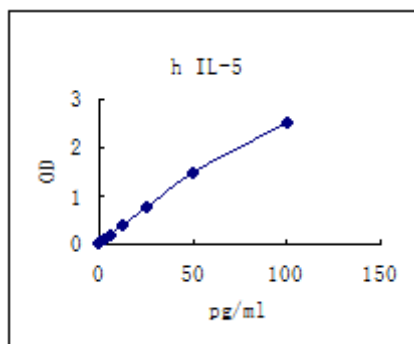
1. 配制各种试剂时要充分混匀，但要避免产生大量泡沫，以免加样时加入大量的气泡，产生加样误差。
2. 为避免交叉污染，在加入不同浓度的标准品、不同样品、不同试剂时谨记及时更换吸头。
3. 为了确保准确的结果，在每次孵育前均需使用新封板胶纸封住反应孔。
4. 显色剂在添加之前，应保持无色，请勿使用已变为蓝色的显色溶液。最佳显色时间对标准曲线很重要，肉眼可见前 3-4 孔有梯度蓝色，后 3-4 孔差别不明显，零孔无蓝色出现即可终止。
5. 每次检测均要做标准曲线，根据样品待测因子的含量，适当稀释或浓缩样本，最好做预实验。

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IL-5标准品浓度为横坐标(X)，生成相应的标准曲线，样品的IL-5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 | 0.020 | 0.028 | 0.024 | — |
| 1.5625 | 0.071 | 0.086 | 0.079 | 0.055 |
| 3.125 | 0.133 | 0.125 | 0.129 | 0.105 |
| 6.25 | 0.216 | 0.206 | 0.211 | 0.187 |
| 12.5 | 0.416 | 0.428 | 0.422 | 0.398 |
| 25 | 0.787 | 0.794 | 0.791 | 0.767 |
| 50 | 1.463 | 1.454 | 1.459 | 1.435 |
| 100 | 2.507 | 2.501 | 2.504 | 2.480 |

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

最低检测人 IL-5 剂量小于 0.8pg/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人IL-5，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 |
|---------------|---------------|------------------------|
| EGF | GM-CSF | bovine FGF acidic |
| G-CSF | IFN- γ | bovine FGF basic |
| IFN- γ | IL-3 | human PDGF |
| IL-2 | IL-4 | porcine PDGF |
| IL-3 | IL-6 | human TGF- β 1 |
| IL-6 | IL-7 | porcine TGF- β 1 |
| IL-8 | TNF- α | |
| IL-10 | | |
| TNF- α | | |

参考文献

1. Takatsu, K. and A. Tominaga (1991) Progress in Growth Factor Research 3:87.
2. Takatsu, K. (1998) Cytokine and Growth Factor Reviews 9:25.
3. Takatsu, K. et al. (1994) Adv. Immunol. 54:134.
4. Sanderson, C.J. (1992) Blood 79:3101.