

## 人CXCL6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: KE00274  
规格: 96T  
灵敏度: 1.2 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的人CXCL6浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

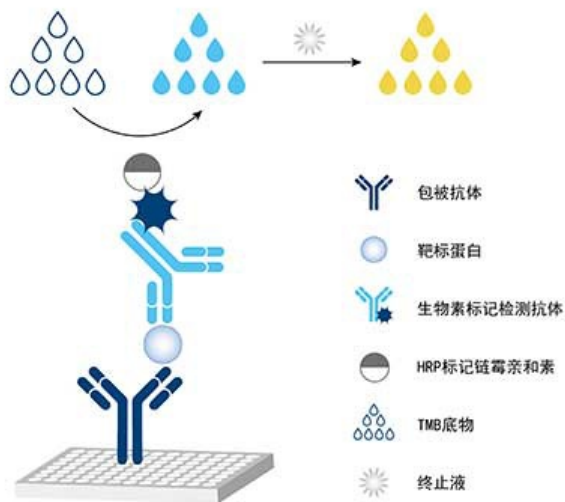
## 目录

|            |   |
|------------|---|
| 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     | 9 |

## 一：背景信息

趋化因子（C-X-C基序）配体6（CXCL6）是属于CXC趋化因子家族的小细胞因子，也称为粒细胞趋化蛋白2（GCP-2）。而CXCL6是嗜中性粒细胞的趋化剂。它通过与趋化因子受体CXCR1和CXCR2相互作用引起其趋化作用。CXCL6的基因位于人类4号染色体上。

## 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 超纯水或去离子水;
- 3.4 洗板机 (亦可手动洗板);
- 3.5 EP管 (用于稀释标准品及样本);
- 3.6 吸水毛巾或滤纸 (用于拍干);
- 3.7 烧杯和量筒;
- 3.8 100 mM PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride) 存储液 (1 g PMSF溶于57 mL异丙醇)，样本需要裂解才用;
- 3.9 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 (100×),<br>biotinylated                                                  | 生物素标记检测抗体浓缩液 (100×) **  | 120 µL/支  | 1 支 |
| Streptavidin-horseradish<br>peroxidase (HRP) (100×)                                         | HRP标记链霉亲和素浓缩液 (100×) ** | 120 µL/支  | 1 支 |
| Sample Diluent PT 3-ec                                                                      | 样本稀释液 PT 3-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<br>(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：<br>1：未开启试剂盒可在2-8℃条件下存放6个月或者在-20℃条件下存放1年<br>2：已开启试剂盒可在2-8℃存放7天<br>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℃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℃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℃存放，避免反复冻融。

七：试剂准备

7.1 洗涤液（1×）：

如果洗涤液（20×）有晶体析出，37℃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（20×），加入570 mL 超纯水或去离子水，得到洗涤液（1×）。

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（100×）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（100×）加 990 μL 抗体稀释液进行配制，轻轻混匀。

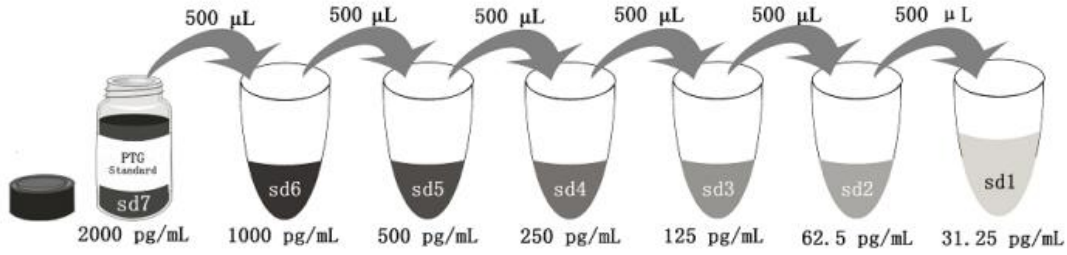
7.4 待检测样本：

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：人血清、血浆样本1:4稀释；细胞上清样本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 3-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 3-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  $\mu$ L,余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本100  $\mu$ L/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 $\times$ )洗涤板条,每孔350-400  $\mu$ L,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  $\mu$ L 检测抗体(1 $\times$ )(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  $\mu$ L HRP标记链霉亲和素(1 $\times$ )(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  $\mu$ L,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  $\mu$ L,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;

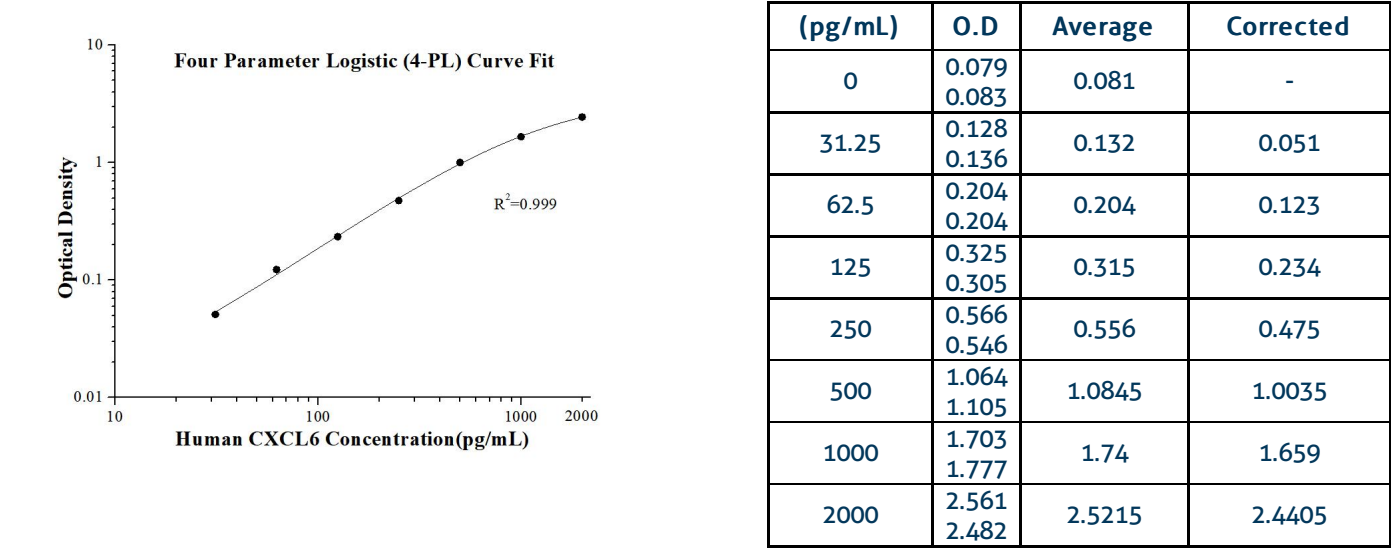
8.12 数据分析:每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值,设置复孔,取其平均值。以标准品的浓度为横坐标,OD 值为纵坐标,使用专业软件(如Origin、ELISACalc等)进行四参数拟合(4-PL),根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度,乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

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 $\mu$ L | 120 分钟   | 4 次   | 覆膜后37°C孵育    |
| 2  | 检测抗体 (1 $\times$ )                           | 100 $\mu$ L | 60 分钟    | 4 次   | 覆膜后37°C孵育    |
| 3  | HRP标记链霉亲和素 (1 $\times$ )                     | 100 $\mu$ L | 40 分钟    | 4 次   | 覆膜后37°C孵育    |
| 4  | 显色 TMB                                       | 100 $\mu$ L | 15-20 分钟 | 不需要洗涤 | 覆膜后37°C孵育,避光 |
| 5  | 终止液                                          | 100 $\mu$ L | 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



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) |    |             |      |         | 板间精密度 (CV 间) |    |             |      |         |
|-------------|----|-------------|------|---------|--------------|----|-------------|------|---------|
| 样本          | 数量 | 平均值 (pg/mL) | 标准差  | 变异系数CV% | 样本           | 数量 | 平均值 (pg/mL) | 标准差  | 变异系数CV% |
| 1           | 20 | 1,818.9     | 82.8 | 4.6     | 1            | 24 | 1,853.5     | 84.7 | 4.6     |
| 2           | 20 | 420.6       | 22.5 | 5.3     | 2            | 24 | 437.0       | 15.6 | 3.6     |
| 3           | 20 | 100.0       | 8.7  | 8.7     | 3            | 24 | 104.8       | 6.4  | 6.1     |

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，进行人CXCL6的加标回收率实验，结果如下：

| 样本类型 | 稀释倍数 | 平均值 (%) | 范围 (%)  |
|------|------|---------|---------|
| 人血清  | 1:4  | 87      | 74-108  |
|      | 1:8  | 91      | 77-105  |
| 细胞上清 | 1:8  | 114     | 108-120 |
|      | 1:16 | 116     | 112-123 |

## 9.4 样本值

应用本试剂盒，检测人血清样本中人CXCL6的浓度。

| 样本类型         | 均值 (pg/mL) | 范围 (pg/mL) |
|--------------|------------|------------|
| 人血清样本 (n=16) | 399.5      | 97.8-797.6 |

细胞上清- MG-63人骨肉瘤细胞在含10%胎牛血清的DMEM培养基中培养至100%融合。收集细胞上清，检测人CXCL6的浓度为993.8 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，此试剂盒中人CXCL6的灵敏度为1.2 pg/mL。

## 9.6 线性

用对应样本稀释液稀释样本，使稀释后的检测值处于标曲范围内，线性数据如下：

(人血清样本预先稀释2倍)

|      |        | 人血清     | 细胞上清    |
|------|--------|---------|---------|
| 1:2  | 均值 (%) | 100     | 100     |
|      | 范围 (%) | -       | -       |
| 1:4  | 均值 (%) | 118     | 108     |
|      | 范围 (%) | 111-123 | 104-114 |
| 1:8  | 均值 (%) | 120     | 115     |
|      | 范围 (%) | 96-133  | 111-117 |
| 1:16 | 均值 (%) |         | 116     |
|      | 范围 (%) |         | 108-123 |

## 十：参考文献

1. Proost P, Wuyts A, Conings R, et al. Human and bovine granulocyte chemotactic protein-2: complete amino acid sequence and functional characterization as chemokines. *Biochemistry*. 1993;32(38):10170-10177. doi:10.1021/bi00089a037
2. Wuyts A, Van Osselaer N, Haelens A, et al. Characterization of synthetic human granulocyte chemotactic protein 2: usage of chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 and in vivo inflammatory properties. *Biochemistry*. 1997;36(9):2716-2723. doi:10.1021/bi961999z
3. Modi WS, Chen ZQ. Localization of the human CXC chemokine subfamily on the long arm of chromosome 4 using radiation hybrids. *Genomics*. 1998;47(1):136-139. doi:10.1006/geno.1997.5100
4. O'Donovan N, Galvin M, Morgan JG. Physical mapping of the CXC chemokine locus on human chromosome 4. *Cytogenet Cell Genet*. 1999;84(1-2):39-42. doi:10.1159/000015209