

人IL-5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: KE00304

规格: 96T

灵敏度: 0.42 pg/mL

检测范围: 7.8-500 pg/mL

用途: 此试剂盒用于定量检测血清、血浆、细胞上清以及尿液中的人IL-5浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

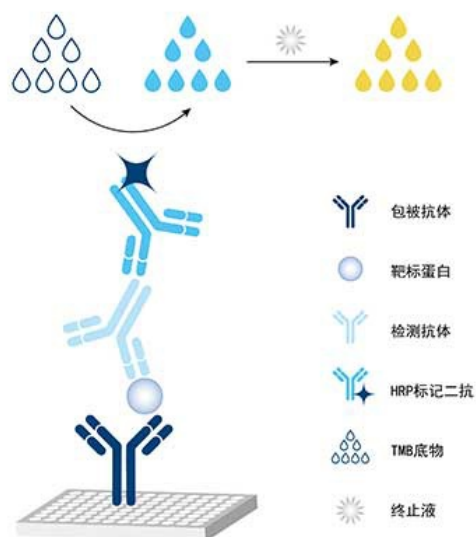
目录

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

白介素-5 (Interleukin-5, IL-5) 是一种可溶性T细胞衍生因子，称为T细胞替代因子 (TRF)，可诱导T细胞活化B细胞分泌免疫球蛋白。IL-5是过敏性炎症部位嗜酸性粒细胞分化、成熟、招募和激活的关键造血细胞因子，在嗜碱性粒细胞的发育、代谢和功能中发挥作用。IL-5通过IL-5受体 (IL-5R) 发挥其生物学活性，IL-5R至少由两条链组成：一条与IL-5结合的低亲和力 α 链，另一条是不结合IL-5的 β 链，但与IL-5 α 链结合，构成高亲和力的IL-5R，其在嗜酸性粒细胞中高表达，对于嗜酸性细胞清除血液及组织中的过敏原起到关键作用。

二：检测原理



◀双抗夹心模式图 (检测抗体不标记)

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 *	1000 pg/瓶	2 瓶
Detection antibody (100×)	检测抗体浓缩液 (100×) **	120 µL/支	1 支
HRP-conjugated antibody (100×)	HRP标记二抗浓缩液 (100×) **	120 µL/支	1 支
Sample Diluent PT 3	样本稀释液 PT 3	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
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℃条件下存放6个月或者在-20℃条件下存放1年 2：已开启试剂盒可在2-8℃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℃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。
- 6.4 尿液：收集尿液后，1000×g离心20 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标记二抗（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标记二抗浓缩液（100×）加 990 μL 抗体稀释液进行配制，轻轻混匀。

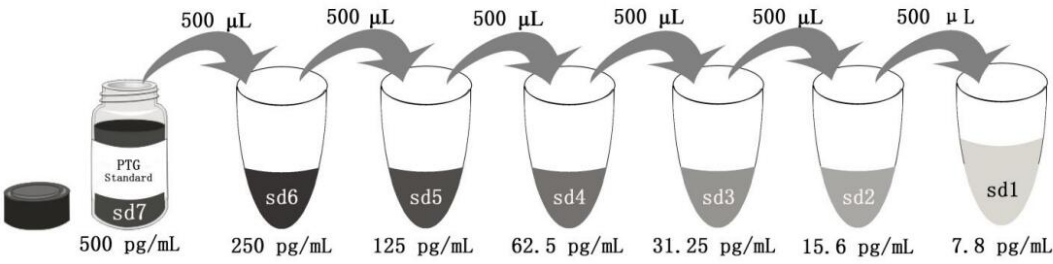
7.4 待检测样本：

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、血浆以及尿液样本1:2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2 mL PT 3 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	2000 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标记二抗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 μ L,余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本100 μ 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 μ 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 μ 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 μ L HRP标记二抗(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 μ 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 μ 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;

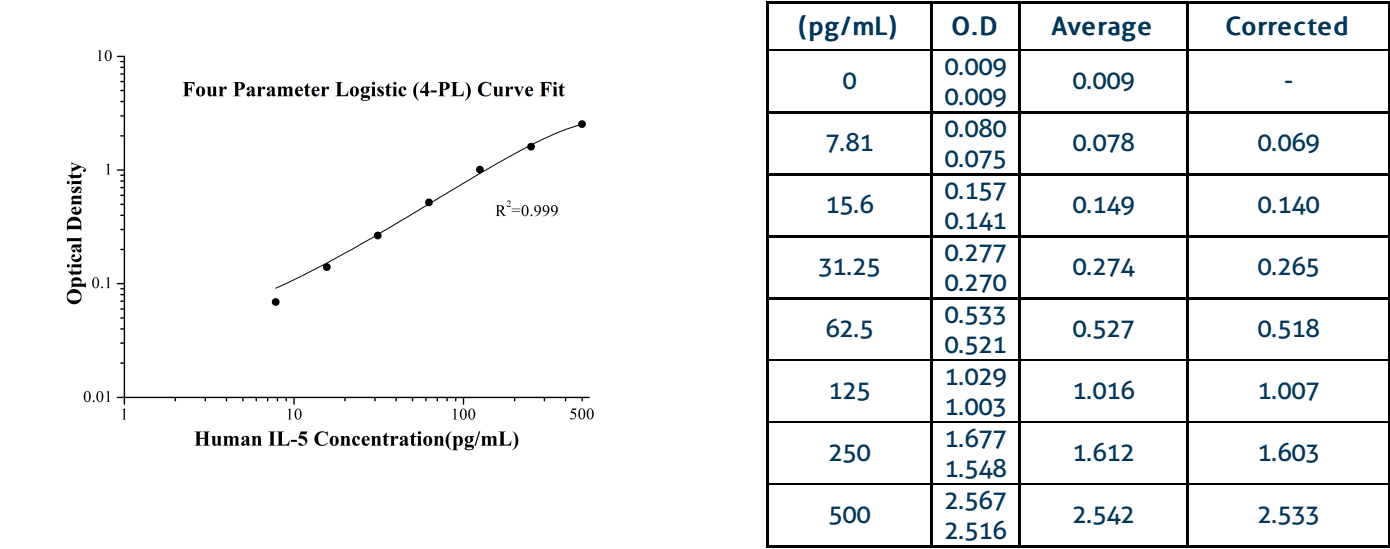
8.12 数据分析:每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值,设置复孔,取其平均值。以标准品的浓度为横坐标,OD 值为纵坐标,使用专业软件(如Origin、ELISACalc等)进行四参数拟合(4-PL),根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度,乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

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 μ L	120 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
2	检测抗体 (1 $\times$)	100 μ L	60 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
3	HRP标记链霉素亲和素 (1 $\times$)	100 μ L	40 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
4	显色 TMB	100 μ L	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37°C孵育,避光
5	终止液	100 μ 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)				
样本	数量	平均值 (pg/mL)	标准差	变异系数CV%
1	20	15.3	0.4	2.7
2	20	61.5	2.3	3.7
3	20	243.9	6.6	2.7

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	14.8	0.8	5.4
2	24	57.3	2.9	5.1
3	24	236.0	22.1	9.4

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IL-5的加标回收率实验，结果如下：

样本类型	稀释倍数	均值 (%)	范围 (%)
人血清	1:2	88	83-91
	1:4	92	85-98
细胞上清	1:2	92	86-100
	1:4	96	90-104
尿液	1:2	89	81-100
	1:4	93	82-102

9.4 样本值

人血清 - 应用本试剂盒，检测16份人血清样本中人IL-5的浓度，所有样品测值均低于标曲最低点7.8 pg/mL。

细胞上清 - 人外周血单个核细胞(PBMC) (1×10^6 cells/mL)在添加8%胎牛血清、5 μ M β -巯基乙醇、2 mM L-谷氨酰胺、100 U/mL青霉素和100 μ g/mL硫酸链霉素的DMEM培养基中培养，用10ug/mL的PHA刺激细胞上清3天和5天，收集细胞上清，检测人IL-5的浓度。

刺激条件	刺激3天(pg/mL)	刺激5天(pg/mL)
未刺激	1.5	2.1
刺激	60.7	66.3

尿液 - 应用本试剂盒，检测8份尿液样本中人IL-5的浓度，所有样品测值均低于标曲最低点7.8 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IL-5的灵敏度为0.4 pg/mL。

9.6 线性

人血清和尿液样本加入高浓度的人IL-5蛋白，梯度稀释后检测样本加标线性，细胞上清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	细胞上清	尿液
1:2	均值 (%)	93	100	97
	范围 (%)	90-96	-	92-101
1:4	均值 (%)	93	101	95
	范围 (%)	89-97	92-112	88-98
1:8	均值 (%)	103	97	97
	范围 (%)	99-108	86-108	91-104
1:16	均值 (%)	105	99	97
	范围 (%)	100-114	87-106	95-100

十：参考文献

1. K Takatsu. et al. (1988) Immunol Rev. 102:107-35.
2. Kiyoshi Takatsu. et al.(2011) Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 87(8):463-85.
3. Taku Kouro. et al. (2009) Int Immunol. 21(12):1303-9.
4. Corrado Pelaia. et al. (2019) Front Physiol.10:1514.