

产品信息和操作指南

Human IL-1 β Precoated ELISA kit

Cat# : 1110122

本试剂盒专用于科研，而非用于诊断

Human IL-1 β
1110122

目 录

产品简介.....	1
知识背景.....	1
试剂盒组分.....	2
需要实验者自行准备的试剂与仪器.....	2
注意事项.....	3
试剂的配制.....	5
操作过程.....	7
结果分析.....	9
试剂盒的保存.....	9
操作步骤一览表.....	10
参考文献.....	11
ELISA 测定中可能出现的问题及解决方法.....	12
达优®ELISA 系列产品.....	15

1、 产品简介:

达优®人 IL-1 β ELISA 试剂盒是通过酶联免疫吸附技术，体外定量检测人血清、血浆、缓冲液或细胞培养液中的 IL-1 β ，可同时检测天然的和重组的 IL-1 β 。本试剂盒为预包被板，“夹心一步”完成，整个过程孵育时间不超过 4 小时，洗涤 6 次，操作时间大大减少。本试剂盒专用于科研，而非用于诊断。

使用前请仔细阅读说明书并检查试剂盒组分，若有任何疑问请与深圳市达科为生物工程有限公司联系，E-mail：RD@dakewe.com.

检测范围：500-15.6 pg/mL

灵敏度：5 pg/mL

重复性：板内变异系数<10%,板间变异系数<15%。

2、 知识背景:

白细胞介素-1 (Interleukin-1, IL-1) 家族蛋白包括 IL-1 α 、IL-1 β 和 IL-1 受体拮抗物。除了皮肤角质化细胞、一些上皮细胞和中枢神经系统的一些细胞之外，IL-1 并不在健康个体的未经刺激的细胞中分泌。生理条件下 IL-1 的浓度仅在 10^{-12} - 10^{-14} M 之间。然而，为了应对刺激（如炎症物质、感染、细菌性内毒素），巨噬细胞和各种其它类型的细胞的 IL-1 分泌量将大大增加（1-4）。

3、 试剂盒组分：

组分	规格	配制
Cytokine standard	2 瓶	干粉状，按瓶上说明操作
Biotinylated antibody	2 管	1: 50 用 Dilution buffer R (1×) 稀释
Streptavidin-HRP	2 管	1: 100 用 Dilution buffer R (1×) 稀释
Dilution buffer R (1×)	3 瓶	即用型
Washing buffer (50×)	1 瓶	1 : 50 用蒸馏水稀释
TMB	1 瓶	即用型
Stop solution	1 瓶	即用型
Precoated ELISA plate	8×12	即用型
封板膜	2 张	即用型
说明书	1 份	

4、 需要实验者自行准备的试剂与仪器：

1. 酶标仪（建议参考仪器使用说明提前预热）
2. 微量加液器及吸头：P10，P50，P100，P200，P1000
3. 蒸馏水或去离子水
4. 全新滤纸
5. 旋涡振荡器和磁力搅拌器

5、 注意事项:

1. 试剂应按标签说明储存,使用前 **室温平衡** 20-30 分钟。实验前室温平衡对 Washing buffer (50×)、Dilution buffer R (1×)、Precoated ELISA plate 和 TMB 有重要意义。
2. 冻干标准品冰上操作,按照标签说明溶解干粉, **充分混匀**,按照一次使用量分装, -20℃贮存,避免反复冻融。
3. 预包被板条使用前,请平衡至室温后再打开外包装袋,实验中不用的板条应立即放回包装中, **密闭封口**, 4℃可保存 1 个月。其余不用试剂应包装好或盖好。
4. Washing buffer (50×)在 4℃保存可能有 **结晶析出**, 务必使结晶完全溶解后(如加热、平衡温度后混匀等)再配制成 1×Washing buffer 工作液。
5. Biotinylated antibody 和 Streptavidin-HRP 体积量很小,使用前请 **高速短暂离心**管子,以使管壁或管盖的液体沉积到管底。
6. 实验操作中请使用一次性的吸头,避免交叉污染。
7. 使用前检查试剂盒内各种试剂;试剂稀释、加样和中止反应充分混匀或者摇匀对实验结果尤为重要,最好使用低速频率振荡器或者反应过程中每 15 分钟手工摇匀一次。
8. 实验板孔加入试剂的顺序应一致,以保证所有反应孔的孵育时间一致。

9. 使用洁净的塑料容器盛装洗涤液。
10. 洗涤过程中反应孔中残留的洗涤液应在**滤纸**上充分拍干，直至滤纸上看不到水印。勿将滤纸直接放入反应孔中吸水。
11. TMB 对光敏感，避免长时间暴露于光下，避免与金属接触影响结果。**有毒，避免与皮肤接触！**准备使用的 TMB 若变为蓝色，表明 TMB 已经污染，请丢弃。请在终止反应后 10 分钟内读取 OD 值。
12. 请严格按照说明书标明的时间和温度进行孵育。冬季室内温度偏低，请使用**恒温箱或培养箱温育**为好。
13. 试剂盒在保质期内使用，且不同批号试剂不要混用。
14. 500 pg/mL 以上的结果为非线性的，根据此标准曲线无法得到精确的结果。大于 500 pg/mL IL-1 β 的样本应以 Dilution buffer R (1 $\times$)稀释后重做。在结果分析时，结合考虑相应的稀释度。
15. 特异性：不与人其它细胞因子反应。

6、试剂的配制：

1. 提前 20 分钟将 **Washing buffer (50×)**和即用溶液从试剂盒中取出，平衡至室温。
2. **Cytokine standard:** 外观为冻干粉。先按标签说明将冻干粉溶解，静置 5-10 分钟，再用 **Dilution buffer R (1×)**稀释到推荐检测浓度。标准品溶解后混匀，准确倍比稀释，严格操作非常重要。标准品的倍比稀释最好在进口的或者硅化的 EP 管中完成，减少非特异性吸附。在实验孔内进行倍比稀释时，注意操作规范，枪头勿刮划预包被板的孔底。母液若有剩余请按照一次用量分装，-20℃保存。

* 推荐标准品浓度梯度为：500 pg/mL、250 pg/mL、125 pg/mL、62.5 pg/mL、31.3 pg/mL、15.6 pg/mL。
3. **Biotinylated antibody:** 1 : 50 用 **Dilution buffer R (1×)**稀释，混匀制成 **Biotinylated antibody** 工作液。
4. **Streptavidin-HRP** : 1 : 100 用 **Dilution buffer R (1×)**稀释，混匀制成 **Streptavidin-HRP** 工作液。

5. Washing buffer (50×): 1 : 50 用蒸馏水稀释。

6. 即用型溶液

- **Dilution buffer R (1×):** 用于稀释 **Cytokine standard**、样本、**Biotinylated antibody** 和 **Streptavidin-HRP**。
- **TMB**
- **Stop solution**

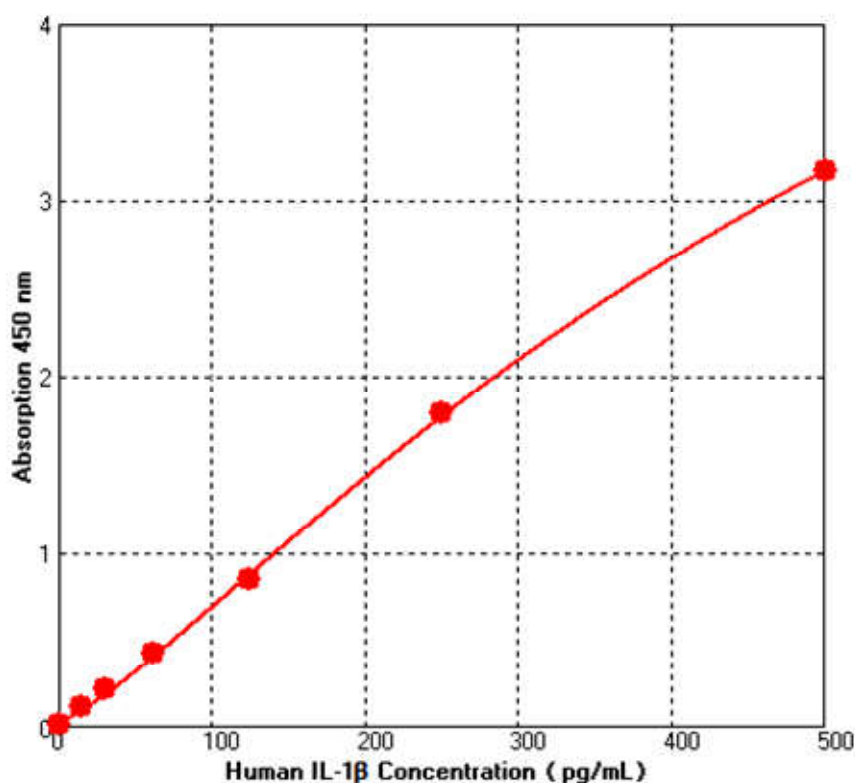
7、操作过程：

1. 使用前，将所有试剂充分混匀，避免产生泡沫。
2. 根据实验孔（空白和标准品）数量，确定所需的板条数目。样本（含标准品）和空白都应做复孔。
3. 加样：100 μL /well 加入稀释后的 Cytokine standard 至标准品孔，100 μL /well 加入样本至样本孔，100 μL /well 加入 Dilution buffer R (1 $\times$)至空白对照孔。
4. 加检测抗体：50 μL /well 加入 Biotinylated antibody 工作液。混匀后盖上封板膜，室温（18-25 $^{\circ}\text{C}$ ）孵育 3 小时。
5. 洗板：扣去孔内液体，300 μL /well 加入 1 $\times$ Washing buffer 工作液；停留 1 分钟后弃去孔内液体。重复 3 次，每一次在滤纸上扣干。
6. 加酶：100 μL /well 加入 Streptavidin-HRP 工作液。盖上封板膜，室温（18-25 $^{\circ}\text{C}$ ）孵育 20 分钟。
7. 洗板：重复步骤 5。
8. 显色：100 μL /well 加入 TMB，室温（18-25 $^{\circ}\text{C}$ ）避光孵育 5-30 分钟，根据孔内颜色的深浅（深蓝色）来判定终止反应。通常显色 10-20 分钟可以达到很好的效果。
9. 终止反应： 100 μL /well 迅速加入 Stop solution 终止反应。

10. 读板: 终止后 10 分钟内, 用检测波长(measurement wavelength) 450 nm 读值。推荐用双波长即检测波长 (measurement wavelength) 450 nm、参考波长或校正波长 (reference wavelength) 610-630 nm 同时读板, 测量结果会更准确。

8、结果分析：

- 1.推荐拟合曲线坐标对数或自然数，拟合方程常见为直线、二次方程及四参数方程，通过各种应用软件拟合选取最佳标准曲线，根据样本 OD 值查找相应浓度。
- 2.稀释的样本计算浓度时应乘以稀释倍数。



注意：本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线来计算样本浓度。

9、试剂盒的保存：

4°C 可稳定保存 12 个月。

10、操作步骤一览表：

加样本或配好的 **Cytokine standard**，设置对照，**100 μ L/well**

无需孵育，直接进行下一步操作

加 **Biotinylated antibody** 工作液，**50 μ L/well**，混匀

室温孵育 3 小时；
洗板 3 次

加 **Streptavidin-HRP** 工作液，**100 μ L/well**

室温孵育 20 分钟；
洗板 3 次

加 **TMB** 显色液，**100 μ L/well**

室温避光显色 5-30 分钟

加 **Stop solution** **100 μ L/well**，终止反应

10 分钟内读板

在 $\lambda=450\text{ nm}$ 处读取吸光值

11、参考文献

- (1) Dinarello, C.A. (1991) Blood. 77:1627.
- (2) Oppenheim, J.J. et al. (1986) Immunol. Today 7:45.
- (3) Dinarello, C.A. and S.M. Wolff (1993) New Engl. J. of Med. 328:106.
- (4) Dinarello, C.A. (1994) Eur. Cytokine Netw. 5:517.
- (5) 刘平 等. 中国现代医生, 2009, 47, 10-11.
- (6) 张文娟 等. 中草药, 2009, 40(4): 601-605

12、ELISA 测定中可能出现的问题及解决方法

问 题	可能的原因	解决方法
1. 非常弱的结果	(1) 温育的时间或温度不够； (2) 显色反应时间太短； (3) 配制缓冲液的蒸馏水有问题； (4) 加入抗体/酶的工作液浓度太低； (5) 酶标仪滤光片不正确； (6) 不正确的试剂储存方式； (7) 试剂盒没有充分平衡； (8) 移液器吸液量不足，吸嘴内壁挂水太多或内壁不清洁。	a. 校正温育箱温度； b. 校正定时钟准确定时； c. 使用新鲜合格的蒸馏水； d. 按照说明书保存试剂盒和准确配制工作液； e. 试剂室温平衡至少 20 分钟，确保所有试剂已平衡至室温（18-25℃）； f. 校正移液器，吸嘴要配套，装吸嘴时要紧密，吸嘴内壁要清洁，最好一次性使用。

2. 标准曲线和测定的重复性差	这是典型的由测定操作引起的问题，包括 (1) 加样本及试剂量不准；孔间不一致； (2) 加样过快，孔间发生污染； (3) 加错样本； (4) 加样本及试剂时，加在孔壁上部非包被区； (5) 不同批号试剂盒中组分混用； (6) 温育时间、洗板、显色时间不一致； (7) 孔内有污染杂物； (8) 酶标仪滤光片不正确； (9) 试剂/样本没有混匀； (10) 血清样本未完全凝固即加入，反应孔内出现纤维蛋白凝固或残留血细胞，易出现假阳性反应等。	a. 重复某一样本时，加样时间尽可能与第一次接近； b. 重复测定样本，操作条件、人员等应尽可能与上次保持一致，以排除这些因素造成的不一致的可能性； c. 样本稀释前应充分混匀； d. 尽可能使用同一移液器并装紧吸嘴。
3. 白板 (阳性对照不显色)	(1) 漏加酶结合物； (2) 洗板液配制中出现问题，如量筒不干净，含酶抑制物（如叠氮钠）等； (3) 添加的试剂错误或者被遗漏； (4) 试剂过期；	a. 请按说明书所示稀释倍数配制； b. 注意不要漏加； c. 每次加液前均应核对标签。

4. 空白背景高	(1) 洗板不干净； (2) 显色液变质； (3) 试剂过期； (4) 试剂配制浓度有误，如酶的浓度过高； (5) 蒸馏水受酶等污染； (6) 试剂混用； (7) 培养箱温度超过 37℃ 或反应时间过长。	a. 浓缩洗液准确配制； b. 50 倍浓缩洗涤液如有结晶则应让结晶于室温全部溶解后再量取稀释； c. 充分洗涤，彻底拍干； d. 加样或加酶拍板的滤纸应弃去不用，不要反复使用，否则易造成污染； e. 吸嘴尽可能一次性使用； f. 使用新鲜蒸馏水； g. 不同批号试剂勿混用； h. 请按说明书所示稀释倍数配制； i. 显色反应时间适当缩短。
----------	---	--

13、达优®ELISA 系列产品

达优®小鼠 ELISA 试剂盒

1210002	Mouse IFN- γ ELISA kit（预包被减步法）	96T
1210112	Mouse IL-1 α ELISA kit（预包被减步法）	96T
1210122	Mouse IL-1 β ELISA kit（预包被减步法）	96T
1210202	Mouse IL-2 ELISA kit（预包被减步法）	96T
1210402	Mouse IL-4 ELISA kit（预包被减步法）	96T
1210502	Mouse IL-5 ELISA kit（预包被减步法）	96T
1210602	Mouse IL-6 ELISA kit（预包被减步法）	96T
1211002	Mouse IL-10 ELISA kit（预包被减步法）	96T
1211202	Mouse IL-12 p70 ELISA kit（预包被减步法）	96T
1211232	Mouse IL-12/IL-23 p40 ELISA kit（预包被减步法）	96T
1211702	Mouse IL-17A ELISA kit（预包被减步法）	96T
1212202	Mouse IL-22 ELISA kit（预包被）	96T
1217102	Mouse TGF- β 1 ELISA kit（预包被）	96T
1217202	Mouse TNF- α ELISA kit（预包被减步法）	96T
1217342	Mouse VEGF-A ELISA kit（预包被）	96T
1218202	Mouse IgE ELISA kit（预包被）	96T
1217392	Mouse MCP-1 ELISA kit（预包被）	96T

达优®人 ELISA 试剂盒

1110002	Human IFN- γ ELISA Kit (预包被减步法)	96T
1110012	Human IFN- α ELISA Kit (预包被)	96T
1110122	Human IL-1 β ELISA Kit (预包被减步法)	96T
1110202	Human IL-2 ELISA Kit (预包被减步法)	96T
1110402	Human IL-4 ELISA Kit (预包被)	96T
1110502	Human IL-5 ELISA Kit (预包被减步法)	96T
1110602	Human IL-6 ELISA Kit (预包被减步法)	96T
1110702	Human IL-7 ELISA Kit (预包被)	96T
1110802	Human IL-8 ELISA Kit (预包被减步法)	96T
1110902	Human IL-9 ELISA Kit (预包被)	96T
1111002	Human IL-10 ELISA Kit (预包被减步法)	96T
1111202	Human IL-12p70 ELISA Kit (预包被减步法)	96T
1111232	Human IL-12/IL-23p40 ELISA Kit (预包被减步法)	96T
1111262	Human IL-6R/CD126 ELISA Kit (预包被减步法)	96T
1111302	Human IL-13 ELISA Kit (预包被减步法)	96T
1111502	Human IL-15 ELISA Kit (预包被)	96T
1111702	Human IL-17A ELISA Kit (预包被)	96T
1111742	Human IL-17F ELISA Kit (预包被)	96T
1112202	Human IL-22 ELISA Kit (预包被减步法)	96T
1112302	Human IL-23 ELISA Kit (预包被减步法)	96T
1113252	Human sIL-2R ELISA Kit (预包被减步法)	96T
1113102	Human IL-31 ELISA Kit (预包被减步法)	96T

1113302	Human IL-33 ELISA Kit（预包被）	96T
1113542	Human CD54/sICAM-1 ELISA Kit（预包被减步法）	96T
1114062	Human CD106/sVCAM-1 ELISA Kit（预包被）	96T
1115302	Human Adiponectin/Acrp30 ELISA Kit（预包被）	96T
1115312	human Resistin ELISA Kit(预包被)	96T
1115402	Human CRP ELISA Kit（预包被）	96T
1117102	Human TGF- β 1 ELISA Kit（预包被）	96T
1117202	Human TNF- α ELISA Kit（预包被减步法）	96T
1117302	Human GM-CSF ELISA Kit（预包被）	96T
1117312	Human G-CSF ELISA Kit（预包被）	96T
1117322	Human EGF ELISA Kit（预包被）	96T
1117342	Human VEGF-A ELISA Kit（预包被）	96T
1117392	Human MCP-1 ELISA Kit（预包被）	96T
1117412	Human MIP-1 α ELISA Kit（预包被）	96T
1117452	Human IP-10 ELISA Kit（预包被）	96T
1117602	Human FGF basic ELISA Kit（预包被）	96T
1117632	Human β -NGF ELISA Kit（预包被）	96T
1117652	Human HGF ELISA Kit（预包被）	96T
1118202	Human IgE ELISA Kit（预包被）	96T
1118302	Human perforin ELISA Kit（预包被）	96T
1118502	Human Granzyme B ELISA Kit（预包被）	96T
1118602	Human PD-1 ELISA kit(预包被)	96T
1118612	Human PD-L1 ELISA Kit(预包被)	96T
1119012	human MMP-1 ELISA Kit(预包被)	96T
1119022	human MMP-2 ELISA Kit(预包被)	96T
1119032	human Total MMP-3 ELISA Kit(预包被)	96T

达优®大鼠 ELISA 试剂盒

1310002	Rat IFN- γ ELISA kit （预包被减步法）	96T
1310122	Rat IL-1 β ELISA kit （预包被）	96T
1310202	Rat IL-2 ELISA kit （预包被减步法）	96T
1310402	Rat IL-4 ELISA kit （预包被）	96T
1310602	Rat IL-6 ELISA kit （预包被）	96T
1311002	Rat IL-10 ELISA kit （预包被减步法）	96T
1311702	Rat IL-17A ELISA kit （预包被）	96T
1317102	Rat TGF- β 1 ELISA kit （预包被）	96T
1317202	Rat TNF- α ELISA Kit （预包被减步法）	96T

ELISA 辅助试剂

1030412	TMB (ready-to-use, 即用型), 1 plate	10 mL
1030011	ELISA 辅助试剂盒	96T

深圳市达科为生物工程有限公司
Dakewe Bio-engineering Co., LTD
 (180701)