

大鼠白细胞介素 3 酶联免疫吸附测定试剂盒

产品编号：MA0819 规格：96 次

产品内容

产品组成	体积/数量
大鼠 IL-3 预包被板	8 孔条×12 个
样品稀释液	30mL
重组大鼠 IL-3 标准品(冻干)	2 支(10ng/支)
生物素标记大鼠 IL-3 抗体	130 μL(效价 1:100)
抗体稀释液	12mL
酶复合物(HRP 标记的链霉亲和素)	130 μL(效价 1:100)
酶复合物稀释液	12mL
浓缩洗涤液(25×)	30mL
显色剂 TMB	10mL
终止液	10mL
封板胶纸	4 张

产品简介

本试剂盒采用双抗体夹心ELISA法，用于检测样品中大鼠 IL-3的浓度。大鼠 IL-3 捕获抗体已经预包被于 酶标板上，当加入样品或标准品时，其中的大鼠 IL-3 会与捕获抗体结合，而其它游离成分则会通过洗涤 被除去。接着，再加入生物素标记的大鼠 IL-3 抗体后，抗大鼠 IL-3 抗体与大鼠 IL-3 接合，形成夹心的免疫复合物，其它游离成分则通过洗涤被除去。随后加入酶复合物，生物素与酶复合物特异性结合，这样酶 复合物上的 HRP 就与夹心的免疫复合物连接起来，而其它游离成分则通过洗涤被除去。最后加入显色剂，若样品中存在大鼠 IL-3，则会形成免疫复合物，其上连接的 HRP 会催化无色的显色剂氧化生成蓝色 物质，而后加入终止液，最终产物呈黄色。通过酶标仪检测，读取 450 nm 处的 OD 值，大鼠 IL-3 浓度与 OD450 值之间呈正比，通过检测标准品绘制标准曲线，对照未知样品中 OD 值，即可计算出样品中大鼠 IL-3 的浓度。

白细胞介素 3(IL-3) 是一种多克隆刺激因子，具有调节造血功能的作用。它由丝裂原或抗原刺激激 活的 T 细胞及一些细胞株产生，主要功能是调节多能干细胞的生长及分化，使之产生各系骨髓细胞。此 外，IL-3 还可以刺激多能干细胞和多种祖细胞的增殖与分化，因此也被称为多重集落刺激因子 (multi-colony stimulating factor, multi-CSF) 和造血细胞生长因子 (hemopoietic cell growth factor, HCGF)。



产品参数：

检测范围	7.8 pg/mL~500 pg/mL
敏感性	3 pg/mL
特异性	系统和其它因子无交叉反应
样本类型	大鼠血清、血浆、体液、组织匀浆或细胞培养上清

使用方法

(一) 样品制备

1.根据样品种类选择相应的处理方法：

(1) 细胞上清：将细胞培养上清液100~500×g离心5min，去除悬浮物后即可。

(2) 血清样品：将全血在室温下静置0.5~2h，待其自然凝固并析出血清后，离心取黄色上清即可(4℃，1,000~2,000×g，10min)，注意请勿吸取沉淀，制备好的血清需置于冰上待用，请勿在其中添加任何防腐剂或抗凝剂；

(3) 血浆样品：使用EDTA对全血进行抗凝处理后，混合均匀置于冰上，离心取黄色上清即可(4℃，1,000~2,000×g，10min)，注意请勿吸取沉淀，制备好的血浆需置于冰上待用；

(4) 组织匀浆/体液：离心去除沉淀即可。

注意：

- ①若待测样品无法及时检测，样品制备完成后，请分装冻存于-20℃，避免反复冻融；
- ②请保证待测样品清澈透明，检测前如发现样品中有悬浮物，需通过离心去除；
- ③为了保证检测结果准确，请勿使用溶血、黄疸、高血脂或污染的样品。

2. 稀释样本

查阅相关文献，预估样品中待测因子的含量，从而确定适当的稀释倍数，使稀释后样品中待测因子的浓度处于ELISA试剂盒的最佳检测范围。根据待测因子含量的不同，分别采取不同的稀释方案：

(1) 待测因子含量在 5~50 ng/mL 范围内，一般按 1:100 稀释，即向 297 μL 样品稀释液中加入3 μL 样品；

(2) 待测因子含量在 0.5~5 ng/mL 范围内，一般按 1:10 稀释，即向 225 μL 样品稀释液中加入25 μL 样品；

(3) 待测因子含量在 7.8~500 pg/mL 范围内，一般按 1:2 稀释，即向 100 μL 样品稀释液中加入100 μL 样品；

(4) 待测因子含量≤7.8 pg/mL，样品一般无需稀释。

以上方案仅供参考，实验中请详细记录样品的稀释方法。

(二) 检测准备工作

3.试剂盒自4℃冰箱取出后，请置于室温平衡20min；如从-20℃取出，各组分需彻底融化后再平衡20min；检测完成后，剩余试剂请及时置于4℃或-20℃保存。

4.将浓缩洗涤液(25×)用双蒸水或去离子水稀释成1×洗涤液。



5.重组大鼠 IL-3标准品的稀释和使用(在使用前2h内准备, 室温操作, 请严格控制在 25~28℃)

(1) 配制 10 ng/mL 标准品: 取 1 mL 样品稀释液加入标准品管内, 盖好后静置 15 min 以上, 然后反复颠倒 / 搓动以助溶解;

(2) 配制 500 pg/mL 标准品: 取 50 μ L 10 ng/mL 的标准品加入有 950 μ L 样品稀释液的 EP 管中, 混匀, 做上标记;

(3) 按下表将 500 pg/mL 标准品用样品稀释液进行倍比梯度稀释。(最高浓度为 500 pg/mL, 将标准品稀释液作为浓度 0 pg/mL。)

管号	稀释液用量(μ L)	复溶后标准品用量(μ L)	标准品的最终浓度(pg/mL)
A	0	1000	500
B	300	300(从A管取出)	250
C	300	300(从B管取出)	125
D	300	300(从C管取出)	62.5
E	300	300(从D管取出)	31.2
F	300	300(从E管取出)	15.6
G	300	300(从F管取出)	7.8
H	300	0	0

注意: 标准品复溶加样后, 剩余部分请丢弃。

6.准备生物素标记大鼠 IL-3抗体工作液

(1) 按每孔需添加100 μ L抗体工作液, 计算其总用量(为弥补操作中的损耗, 需多配制 100~200 μ L);

(2) 按1 μ L生物素标记大鼠 IL-3抗体添加99 μ L抗体稀释液的比例配制工作液, 轻轻混匀。

7.准备酶复合物工作液(需在使用前1h内准备)

(1) 按每孔需添加100 μ L酶复合物工作液, 计算其总用量(为弥补操作中的损耗, 需多配制100~200 μ L);

(2) 按1 μ L酶复合物添加99 μ L酶复合物稀释液的比例配制工作液, 轻轻混匀。

(三) 检测流程

8.通过计算确定一次实验所需的板条数, 取出所需板条放置于框架内, 多余的板条请放回铝箔袋密封, 保存于4℃或-20℃。

注意:

①标准品和样品建议做双复孔检测;

②每次实验均需绘制标准曲线。

9.将用样品稀释液稀释后的样品和不同浓度标准品(100 μ L/孔)分别加入相应孔中, 用封板胶纸封住反应孔, 37℃孵育90min。

注意:

①请查阅相关文献确定样品中待检测蛋白的大致浓度, 若其大于本试剂盒标准曲线的最大标准品浓度, 请将样品适当稀释后再进行检测;

②整个加样过程不宜超过10min, 否则可能会影响检测结果。

10.甩去酶标板内液体, 无需洗板, 将板倒扣在吸水纸上拍干。



11.加入稀释后的生物素标记大鼠 IL-3抗体工作液(100 μ L/孔), 用封板胶纸封住反应孔, 37 $^{\circ}$ C孵育60min。

12.洗板5次, 每孔1 \times 洗涤液用量为300 μ L, 注入与吸出间隔15~30s, 洗完后将板倒扣在吸水纸上拍干。

注意: 洗涤过程至关重要, 洗涤不充分会导致结果产生较大误差。

13.加入稀释后的酶复合物(100 μ L/孔), 用封板胶纸封住反应孔, 37 $^{\circ}$ C避光孵育30min。

14.洗板5次, 方法同步骤12;

15.加入显色剂TMB(100 μ L/孔), 用封板胶纸封住反应孔, 避光37 $^{\circ}$ C反应10~25min。注意:

- ①在保存和使用时, 请勿将TMB接触氧化剂和金属;
- ②因实验室条件差异, 最佳显色时间会有所不同, 反应充分时肉眼可见标准品的前3~4孔有明显的梯度蓝色。

16.加入终止液(100 μ L/孔), 混匀后即刻使用酶标仪测量OD450, 同时设定540nm或570nm作为校正波长, 即可计算得到校正吸光度值(OD450-OD540或OD450-OD570);

注意: 读取OD值建议在10min内完成。

(四) 数据分析

17.绘制标准曲线。以标准品浓度作横坐标, OD值作纵坐标, 利用计算机软件作四参数逻辑(4-PL)曲线拟合创建标准曲线, 通过样品的OD值即可在标准曲线上计算出其相应浓度。

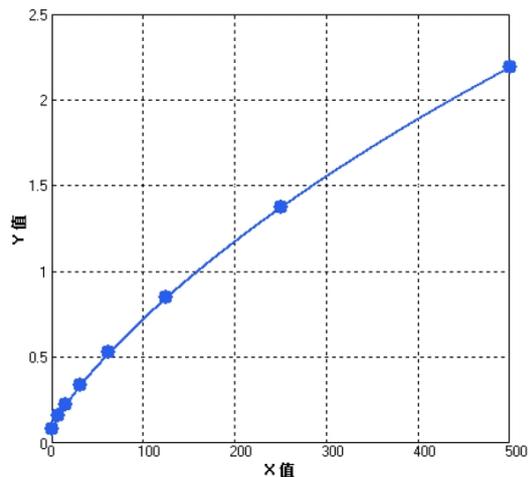
注意:

- ①复孔OD值在20%的差异范围内结果才有效, 复孔OD值取平均后可作为测量值;
- ②若样品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。

标准曲线范例

大鼠 IL-3参考标准曲线

标准品浓度	O.D.
0 pg/mL	0.079
7.8 pg/mL	0.163
15.6 pg/mL	0.226
31.2 pg/mL	0.337
62.5 pg/mL	0.528
125 pg/mL	0.849
250 pg/mL	1.375
500 pg/mL	2.191



注意: 本图仅供参考, 应以同次试验标准品所绘标准曲线计算样品含量。

保存条件



2~8℃保存，自生产之日起6个月有效；长期储存请置于-20℃，自生产之日起12个月有效。

注意事项

1. 浓缩洗涤液低温情况下可能会出现结晶，请水浴加热使结晶完全溶解后再配制工作液；
2. 严禁混用不同批号试剂盒的组分；
3. 加样过程请避免产生气泡，实验操作过程中一定要保证试剂充分混匀，否则会使结果产生较大误差；
4. 说明书中提到的室温条件，请严格控制在25~28℃；
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；
6. 本产品仅限科研使用。

J240101

