

产品说明书

人白细胞介素 10 ELISA 试剂盒 (Human IL-10 ELISA KIT)

产品货号: H6126S, H6126M, H6126L

产品规格: 24T, 48T, 96T

产品内容:

| 组分 \ 规格 | 24T | 48T | 96T | 使用方法 | 开封后保存条件 |
|------------------------|---------|---------|-----------|--------------------|-----------|
| A. 标准品 | 2000 pg | 2000 pg | 2×2000 pg | 按说明书进行稀释 | -20℃可存放一月 |
| B. 标准稀释液 | 16 mL | 16 mL | 16 mL | 即用型 | 4℃可存放一月 |
| C. 浓缩生物素化抗体 (100×) | 30 μL | 60 μL | 2×60 μL | 按说明书进行稀释 (现配现用) | |
| D. 生物素化抗体稀释液 | 16 mL | 16 mL | 16 mL | 即用型 | |
| E. 浓缩酶结合物 (避光 100×) | 30 μL | 60 μL | 2×60 μL | 按说明书进行稀释 (现配现用) | |
| F. 酶结合物稀释液 | 16 mL | 16 mL | 16 mL | 即用型 | |
| G. 浓缩洗涤液 (20×) | 16 mL | 16 mL | 25 mL | 即用型 | |
| H. 显色剂 (避光) | 6 mL | 6 mL | 12 mL | 即用型 | |
| I. 终止液 | 12 mL | 12 mL | 12 mL | 即用型 | |
| J. 预包被 96 孔板 | 8×3 | 8×6 | 8×12 | 即用型 | 密封干燥 4℃保 |
| K. 封板胶纸 | 1 张 | 2 张 | 4 张 | 即用型 | 存 |

注: 终止液和显色剂具有腐蚀性, 一旦接触到液体, 请尽快用大量清水冲洗。

储存条件

4℃避光保存, 有效期见外包装。开封后, 保存温度详见说明书。

产品介绍

Human IL-10 ELISA Kit (Human Interleukin-10 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay Kit), 即人白细胞介素 10 ELISA 试剂盒, 可以定量检测人血清、血浆或细胞培养上清液等样本中的天然和重组 IL-10 浓度。

白细胞介素 10 又称细胞因子合成抑制因子(CSIF), 是一种多效性细胞因子, 可以在多种类型细胞中发挥免疫抑制

或免疫刺激的作用。人, 大鼠和小鼠 IL-10 cDNA 序列均含 178 个氨基酸残基, 内有 18 氨基酸信号肽序列, 成熟 IL-10 分子为 160 氨基酸残基, 小鼠和人 IL-10 分子中分别含 5 个和 4 个半胱氨酸残基, 分子量为 35-40 kDa。小鼠和人 IL-10 基因都定位于第 1 号染色体, 其基因组包括 5 个外显子和 4 个内含子。人和小鼠 IL-10 在 DNA 和氨基酸水平上分别有 81% 和 73% 的同源性。人 IL-10 可作用于鼠源性细胞, 而小鼠 IL-10 对人的细胞则无交叉反应。

在人类, 某些 CD4⁺T 细胞克隆、来自 AIDS 病人 B 细胞系、EBV 感染的淋巴母细胞、Burkitt 氏淋巴瘤、活化单核细胞、外周血 T 细胞均可产生 IL-10。IL-10 的拮抗剂可



能具有抗 EB 病毒的作用，而 IL-10 通过促进单核细胞表达 IL-1ra 有可能成为抗炎症的治疗手段，动物实验表明，IL-10 可有效地避免 LPS 诱导小鼠休克而造成的死亡。

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法检测样品中人 IL-10 浓度。在人 IL-10 单克隆抗体预包被酶标板中加入适度稀释的样品和标准品，其中的 IL-10 会与其单抗结合，洗去游离成分；加入生物素化的抗人 IL-10 抗体，抗人 IL-10 抗体与结合在单抗上的人 IL-10 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-10，辣根过氧化物酶会使无色的显色剂出现蓝色；加终止液变为黄色。在 450nm 下测 OD 值，人 IL-10 浓度与 OD 450 值之间呈正比，可通过绘制标准曲线计算出样品中人 IL-10 浓度。

使用方法

1. 样品准备

- (1) 细胞上清样品：4℃约1000 ×g离心10 min取上清。
- (2) 血清样品：使用不含热原和内毒素的试管收集血液，室温静置30 min，4℃约1000 ×g离心10 min取黄色上清。
- (3) 血浆样品：使用EDTA、柠檬酸盐、肝素作为抗凝剂收集血浆，4℃约1000 ×g 离心15 min取黄色或淡黄色上清。

注：

- a. 样品制备好后置于冰上待用。
- b. 若待测样品不能及时检测，样品制备好后可先进行分装，于-20℃或-80℃冻存，避免反复冻融。
- c. 室温（25℃-28℃）解冻，温度不可高于37℃。
- d. 请勿使用溶血、高血脂或污染的样品检测。
- e. 如果血清中含有大量颗粒，检测前先离心或过滤去除。
- f. 可根据实际情况，将样品做适当倍数稀释（可做预实验，以确定稀释倍数）。

2. 试剂准备

- (1) 试剂盒提前30 min从冰箱中取出，室温解冻。

(2) 标准品：将1 mL标准稀释液加入冻干标准品中，静置15 min，用移液枪轻轻吸打混匀，标准品浓度为2000 pg/mL，根据需要进行稀释。

标准品稀释方法

| 溶液 | 浓度 (pg/mL) | 加入溶液 (μL) | 标准品稀释液 (μL) |
|---------|------------|-----------|-------------|
| A (标准品) | 2000 | — | 1000 |
| B | 500 | 250A | 750 |
| C | 250 | 500B | 500 |
| D | 125 | 500C | 500 |
| E | 62.5 | 500D | 500 |
| F | 31.25 | 500E | 500 |
| G | 15.625 | 500F | 500 |
| H | 7.8 | 500G | 500 |

(3) 生物素化抗体工作液：将浓缩生物素化抗体用生物素化抗体稀释液稀释 (1:100)，现配现用。

(4) 酶结合物工作液：将浓缩酶结合物用酶结合物稀释液稀释 (1:100)，现配现用。

(5) 洗涤缓冲液：将浓缩洗涤液用双蒸水稀释 (1:20)，若从冰箱中取出的浓缩洗涤液有结晶，可加热并轻轻摇晃使结晶溶解再进行配制，未用完的4℃保存。

注：

- a. 稀释后的标准品不可重复使用，未用完的标准品分装，于-20℃或-80℃冻存，避免反复冻融。
- b. 浓缩生物素化抗体、浓缩酶结合物稀释前请先离心处理，使管内液体沉入底部。
- c. 不同批号试剂不可混用。
- d. 混匀要充分，最好使用微量振荡器（用最低频率进行震荡）。

3. 操作步骤

(1) 根据待测样品和标准品的数量计算实验所需的预包被板条数，增加一孔作为对照。

(2) 分别将样品和不同浓度的标准品（每孔100 μL）加入相应的孔中，用封板胶纸封住反应孔，37℃孵育90 min。



(3) 每孔注入350 μL 洗涤液进行洗板（自动洗板机注入与吸出间隔15-30 s, 手工洗板静置30 s后甩尽液体），洗板4次，最后一次置于厚吸水纸上拍干。

(4) 将生物素化抗体工作液（每孔100 μL ）加入相应的孔中，用封板胶纸封住反应孔，37°C孵育60 min。

(5) 洗板4次（同上）。

(6) 将酶结合物工作液（每孔100 μL ）加入相应的孔中，用封板胶纸封住反应孔，37°C孵育30 min。

(7) 洗板4次（同上）。

(8) 加入显色剂（每孔100 μL ），37°C避光孵育10-20 min。

(9) 加入终止液（每孔100 μL ），混匀后立即测量OD值。

（于450 nm处测量，操作时间在5 min以内。）

注：

- 每步使用新的封板胶纸，防止污染。
- 孵育温度和时间要适当，孵育时不可在变温环境中，时间不可过短，若标准曲线两点之间区别低，可适当延长底物孵育时间。
- 洗涤时每孔充满洗涤液，倾倒时迅速，洗涤酶标板应充分拍干，不要将吸水纸放入酶标反应孔中吸水。
- 整个实验应连续操作，不可间断，在实验开始前准备好样品和试剂。

4. 结果分析

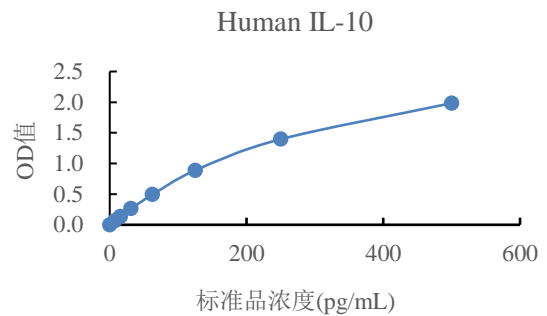
(1) 每个标准品和样品的 OD 值应减去空白对照的 OD 值；如果做复孔，差异范围在 20% 以内有效，其平均值可作为测量值。

(2) 绘制标准曲线时，以标准品浓度为横坐标 (X)，OD 值为纵坐标 (Y)。样品的 IL-10 含量可通过样品 OD 值由标准曲线换算得出。

(3) 若样品 OD 值高于标准曲线上限，应适当稀释后重新测定，计算浓度时应乘以样品的稀释倍数。

(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 | 0.028 | 0.032 | 0.030 | — |
| 7.8 | 0.096 | 0.092 | 0.094 | 0.064 |
| 15.625 | 0.169 | 0.162 | 0.165 | 0.135 |
| 31.25 | 0.294 | 0.295 | 0.294 | 0.264 |
| 62.5 | 0.520 | 0.525 | 0.522 | 0.492 |
| 125 | 0.917 | 0.918 | 0.917 | 0.887 |
| 250 | 1.425 | 1.428 | 1.426 | 1.396 |
| 500 | 2.013 | 2.015 | 2.014 | 1.984 |



本图仅供参考，以同次试验结果所绘标准曲线为准



常见问题及解决方法

| 问题 | 原因 | 解决办法 |
|-----------------|----------------------|-----------------------------------|
| 无颜色 | 不同批号的试剂混合使用 | 重新检查试剂的标签，确保所有组分都属于同一批号。 |
| | 试剂配制、使用有误 | 重做试验，严格按说明书操作。 |
| | HRP 酶污染了叠氮钠 | 使用新配制的试剂，禁含叠氮钠 |
| 颜色弱 | 产品超过有效期 | 检查产品有效期 |
| | 孵育时间过短 | 检查孵育时间 |
| | 使用的试剂被污染 | 检查试剂是否被污染 |
| | 洗涤操作不规范 | 检查洗涤是否充分，每孔是否有残留的洗液 |
| | | 洗涤时，每孔完全充满洗涤缓冲液，倾出时要迅速 |
| 检查或每孔加样量的体积是否准确 | | |
| 仪器设定不正确 | 检查仪器设定、滤光片的使用等是否正确 | |
| 背景过高 | 孵育温度和时间不适当 | 确定每一试验步骤的孵育温度和时间是否适当 |
| | 酶加量过多 | 加酶前验看移液器调节量是否准确 |
| | | 检查稀释度，必要时进行效价测定 |
| 全部板子变成规则的蓝色 | 洗涤不充分，仍有残留物 | 检查每孔是否有残留的洗液 |
| | | 使用洗板机充分洗涤 |
| | 酶结合物太多 | 检查稀释度，必要时进行效价测定 |
| CV 值过高 | 操作不慎或洗涤不充分 | 严格按照说明书操作，特别是洗板步骤 |
| | 酶标板干板，未使用封板膜或封板膜重复使用 | 每两个步骤间酶标板保持湿润，每个步骤使用新的封板膜 |
| | 移液器不准，吸头重复使用 | 检查并校准移液器，每次取样更换新的吸头 |
| 标准曲线两点间差别低 | 酶结合物、检测抗体不足 | 检查稀释度，必要时进行效价测定 |
| | 板子显色不足 | 延长底物孵育时间 |
| 无期望的阳性信号 | 样品中无相应待检测物质 | 使用内参对照，或重复实验，重新考虑实验参数 |
| | 样品基质遮盖检测 | 对样品进行稀释 |
| 边缘效应 | 工作环境不均衡 | 孵育时避免在变温环境中进行 |
| 漂移 | 实验过程中短 | 整个实验应连续操作，不可间断，在实验开始前准备好样品和试剂 |
| | 试剂未按说明书平衡至室温 | 在正式进行实验操作前，所有试剂平衡至室温（除说明书中有其它要求外） |

特异性

本试剂盒可定量检测天然和重组人 IL-10，均不与下列细胞因子及蛋白发生反应。

| | |
|----------|---|
| 重组人细胞因子 | IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-12, IL-12p40, IL-17, Leptin, IFN- γ , TNF- α , TNF- β |
| 重组小鼠细胞因子 | IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12, IL-12p40, IL-17, Leptin, IFN- γ , TNF- α |
| 重组大鼠细胞因子 | IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, Leptin, IFN- γ , TNF- α |

