

# 小鼠白细胞介素4酶联免疫吸附测定试剂盒

Mouse IL-4 ELISA Kit

本产品需冰袋运输。保存于4°C，保质期6个月；保存于-20°C，保质期12个月。

## 产品参数

货号	HJ179
规格	96次
检测范围	7.8 pg/mL~500 pg/mL
敏感性	2 pg/mL
特异性	系统和其它因子无交叉反应
样本类型	小鼠血清、血浆、体液、组织匀浆或细胞培养上清

## 产品简介

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法检测样品中小鼠 IL-4 的浓度。小鼠 IL-4 捕获抗体已经预包被于酶标板上，当加入样品或标准品时，其中的小鼠 IL-4 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小鼠 IL-4 抗体后，抗小鼠 IL-4 抗体与小鼠 IL-4 结合，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，若样品中存在小鼠 IL-4，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，小鼠 IL-4 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，即可计算出样品中小鼠 IL-4 的浓度。

## 背景简介

白细胞介素 4(IL-4) 是一种多功能细胞因子，主要是由激活的 T 淋巴细胞、肥大细胞与骨髓基质细胞表达。IL-4 因为糖基化不同，分子量从 15 到 19 kDa 不等。

IL-4 对多种细胞都起到调节免疫反应功能的作用，其可以参与 B 细胞的激活过程，是 DNA 合成的协同刺激分子，还能诱导静息 B 细胞上 II型 MHC ( 主要组织相容复合体 ) 分子的表达。IL-4 还能增强 IgE 与 IgG1 的分泌以及在细胞表面的表达，并可以调节淋巴细胞和单核细胞上对 IgE 低亲和 Fc 受体的表达。IL-4 在抗体亚型转换中也起到重要的调节作用，是 T 辅助前体细胞向 Th2 细胞分化的重要调节因子，从而间接调节体液免疫以及抗体的生成。此外，IL-4 基因在机体中的遗传变异可导致缺血性中风易感性提高，以及脑血管意外或脑梗塞等疾病的发生。

## 产品内容

组分	体积或数量
小鼠IL-4预包被板	8孔条×12个
样品稀释液	30 mL
重组小鼠IL-4标准品(冻干)	2支(10 ng/支)
生物素标记小鼠IL-4抗体	130 μL(效价1:100)
抗体稀释液	12 mL
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	12 mL
浓缩洗涤液(25×)	30 mL
显色剂TMB	10 mL
终止液	10 mL
封板胶纸	4张

## 操作步骤

### 样品制备

#### 1. 根据样品种类选择相应的处理方法：

- A. 细胞上清：将细胞培养上清液100~500×g离心5 min，去除悬浮物后即可；
- B. 血清样品：将全血在室温下静置0.5~2 h，待其自然凝固并析出血清后，离心取黄色上清即可（4°C, 1,000~2,000×g, 10 min），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；
- C. 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°C, 1,000~2,000×g, 10 min），注意请勿吸取沉淀，制备好的血浆需置于冰上待用；
- D. 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°C，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. 稀释样品

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。

## 检测准备工作

3. 试剂盒自 4°C 冰箱取出后,请置于室温平衡 20 min; 如从 -20°C 取出,各组分需彻底融化后再平衡 20 min; 检测完成后,剩余试剂请及时置于 4°C 或 -20°C 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. 重组小鼠 IL-4 标准品的稀释和使用(在使用前 2 h 内准备, 室温操作, **请严格控制在 25~28°C**)
  - 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 μL 10 ng/mL 的标准品加入有 950 μL 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(μL)	复溶后标准品用量(μL)	标准品的最终浓度(pg/mL)
A	0	1,000	500
B	300	300(从 A 管中取)	250
C	300	300(从 B 管中取)	125
D	300	300(从 C 管中取)	62.5
E	300	300(从 D 管中取)	31.2
F	300	300(从 E 管中取)	15.6
G	300	300(从 F 管中取)	7.8
H	300	0	0

**注意:** 标准品复溶加样后, 剩余部分请丢弃。

6. 准备生物素标记小鼠 IL-4 抗体工作液
  - ① 按每孔需添加 100 μL 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 μL);
  - ② 按 1 μL **生物素标记小鼠 IL-4 抗体** 添加 99 μL **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 1 h 内准备)
  - ① 按每孔需添加 100 μL 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 μL);
  - ② 按 1 μL **酶复合物** 添加 99 μL **酶复合物稀释液** 的比例配制工作液, 轻轻混匀。

## 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°C 或 -20°C;  
**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 μL/孔)分别加入相应孔中, 用封板胶纸封住反应孔, 37°C 孵育 90 min;  
**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 10 min, 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小鼠 IL-4 抗体工作液(100 μL/孔), 用封板胶纸封住反应孔, 37°C 孵育 60 min;

- 12.**洗板 5 次,每孔 1×洗涤液用量为 300  $\mu\text{L}$ ,注入与吸出间隔 15~30 s,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  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ),用封板胶纸封住反应孔,37°C避光孵育 30 min;
- 14.**洗板 5 次,方法同步骤 12;
- 15.**加入 显色剂 TMB(100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ),用封板胶纸封住反应孔,避光 37°C反应 10~25 min;  
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  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ),混匀后即刻使用酶标仪测量 OD450,同时设定 540 nm 或 570 nm 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 10 min 内完成。

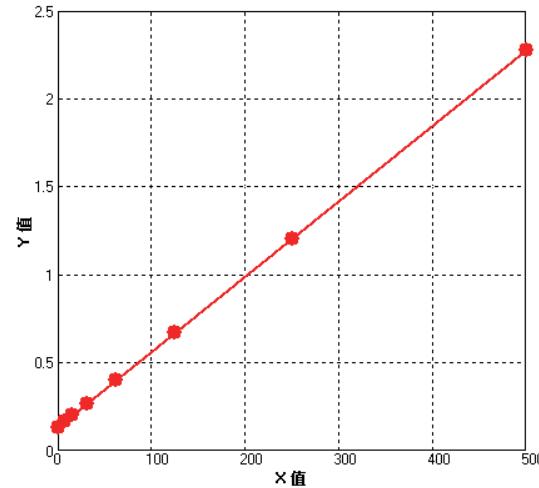
### 数据分析

- 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

小鼠 IL-4 参考标准曲线

标准品浓度	O.D.
0 pg/mL	0.134
7.8 pg/mL	0.168
15.6 pg/mL	0.201
31.2 pg/mL	0.268
62.5 pg/mL	0.402
125 pg/mL	0.670
250 pg/mL	1.205
500 pg/mL	2.276



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。

### 注意事项

- 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;
- 严禁混用不同批号试剂盒的组分;
- 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;
- 说明书中提到的室温条件,请严格控制在 25~28°C;
- 为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作;
- 本产品仅限科研使用。