

本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！

FineTest®

人白细胞介素 6 (IL-6) ELISA 试剂盒

Human IL-6 (Interleukin 6) ELISA Kit

基因敲除 (KO) 验证

产品货号: EH0201

版本号: V4.1

包装规格: 48T/96T

请勿将不同货号、不同批次号的试剂混用，否则试剂盒将无法正常工作
使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，可通过以下方式联系我们：

销售部电话 027-86697005

技术部电话 18064071591 (ELISA 售后)

技术部电话 18107218793 (ELISA 售前)

电子邮箱 sales2@fn-test.com

网 址 <https://www.fn-test.cn/>

复购时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

如有更大包装需求可定制。

武汉菲恩生物科技有限公司.

湖北省武汉市东湖新技术开发区高新二路 388 号武汉光谷国际生物医药企业加速器 1.2 期 C22 栋一层、二层(430206)

技术支持相关文件

文件名称	样品制备指南	ELISA 实验操作流程	ELISA 实验手工洗板	TMB 显色精准控制	标曲和浓度计算软件 CurveExpert1.4(含使用教程)
网址	https://www.fn-test.cn/downloads/	http://www.fn-test.cn/videos/elisa-kit-video/	http://www.fn-test.cn/videos/菲恩生物-elisa实验手工洗板/	http://www.fn-test.cn/knowledge-share/tmb-color-rendering-precise-control/	http://www.fn-test.cn/download/
二维码					

性能介绍

用途	用于体外定量检测血清，血浆，细胞培养上清或其它生物样品中的 IL-6。		
适用种属	Human	实验方法	双抗体夹心法
检测范围	4.688-300pg/ml (1pg=110mIU)	灵敏度	2.813pg/ml
检测时长	4 小时(不含平衡和样品准备时间)		
单孔样品最大用量	血清：50 ul；血浆：50 ul；细胞培养上清：100ul；细胞裂解液或组织裂解液：100ul；其它液体样品：50ul		
特异性	特异性和 IL-6 结合，并经过 KO 验证，与其它类似物无明显交叉反应		
储存条件	未启封试剂盒 2-8°C(严禁冻存)，有效期见盒面标签		

检测数据和稀释比请见说明书第 6-7 页

背景简介

Uniprot ID: P05231

白细胞介素 6 (Interleukin-6, IL-6) 是一种多功能的细胞因子，由多种细胞产生，包括单核细胞、淋巴细胞、血管内皮细胞、成纤维细胞、骨髓成纤维细胞、上皮细胞等。它在机体的炎症反应、免疫反应、急性期反应等方面都发挥着重要作用。

检测原理

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法，实验时长 4 小时。试剂盒中的酶标板已预先包被抗 IL-6 的抗体。将标准品、适度稀释的待测样品分别加入相应孔中，孵育后洗去未结合的成分。加入生物素-检测抗体，生物素-检测抗体与已经结合在包被抗体上的 IL-6 相结合。洗去未结合的成分后，加入 HRP-链霉亲和素(SABC)。再洗去未结合的成分，加入 TMB 显色底物，TMB 在辣根过氧化物酶(HRP)的催化下呈现蓝色，加反应终止液后变成黄色。用酶标仪在 450 nm 波长测 OD 值。通过绘制标准曲线计算样品中 IL-6 的浓度。目的物质的浓度与 OD450 值之间呈正比。

各组件及开启后保存条件

未启封的试剂盒，请保存在 2-8℃。开启后，保存条件见如下表格所示：

组件	名称	规格(48T)	规格(96T)	开启后保存条件
E001	Elisa 酶标板(可拆卸) ELISA Microplate(Dismountable)	8 孔×6 条	8 孔×12 条	将未使用的孔放入拉链铝箔袋中，并加入干燥剂，密封保存。可在 2-8℃ 保存 1 个月；在-20℃ 保存 12 个月。
E002	冻干标准品 Lyophilized Standard	1 支	2 支	将未使用的标准品放入干燥剂包中。可在 2-8℃ 保存 1 个月；在-20℃ 保存 12 个月。
E003	浓缩生物素-抗体 100X Biotin-labeled Antibody	1 支 60ul	1 支 120ul	2-8℃ (避光)
E034	浓缩 HRP-链霉亲和素 100X HRP-Streptavidin Conjugate(SABC)	1 支 60ul	1 支 120ul	
E024	TMB 显色底物 TMB Substrate	1 瓶 5ml	1 瓶 10ml	
E039	样品稀释液 Sample Dilution Buffer	1 瓶 10ml	1 瓶 20ml	2-8℃
E040	抗体稀释液 Antibody Dilution Buffer	1 瓶 5ml	1 瓶 10ml	
E049	SABC 稀释液 SABC Dilution Buffer	1 瓶 5ml	1 瓶 10ml	
E026	反应终止液 Stop Solution	1 瓶 5ml	1 瓶 10ml	
E038	浓缩洗涤液 25X Wash Buffer 25X	1 瓶 15ml	1 瓶 30ml	
E006	覆膜	3 张	5 张	
E007	说明书	1 份	1 份	

注意：试剂瓶内提供的液体试剂体积比标签标明的稍多。请使用移液器精确量取并做相应比例稀释。

所需器材和试剂

- 1、酶标仪(波长 450nm 滤光片)
- 2、37°C 恒温箱(不推荐使用细胞用 CO₂ 培养箱)
- 3、自动洗板机或多道移液器/5ml 滴管(手工洗板用)
- 4、精密的单道(0.5-10μL, 5-50μL, 20-200μL, 200-1000μL)和多通道移液器(移液器使用前需校准)。
- 5、无菌的 EP 管及一次性吸头
- 6、吸水纸及加样槽
- 7、去离子水或蒸馏水

样品采集及保存

以下样品处理步骤为精简操作，详细内容请查看第二页样品制备指南网址或二维码。

1、血清

全血样本室温放置 2 小时或 2-8°C 过夜。1000×g 离心 20 分钟，取上清。可立即检测，或按一次使用量分装冻存于 -20°C 或 -80°C。

2、血浆

抗凝剂推荐使用 EDTA-Na₂/K₂，样品采集后 30 分钟内于 2-8°C，1000×g 离心 15 分钟，取上清。可立即检测，或按一次使用量分装冻存于 -20°C 或 -80°C。其他抗凝剂的使用及选择请查看样品制备指南。

3、组织样本

组织样本一般制成组织匀浆，处理方法如下：

- 3.1、将目标组织置于冰上，用预冷的 PBS 缓冲液(0.01M, pH=7.4)洗涤去除残留的血液，称重后备用。
- 3.2、在冰上用裂解液研磨组织匀浆。加入裂解液的体积取决于组织的重量，一般情况每 1g 组织碎片使用 9ml 裂解液。另外建议在裂解液中加入蛋白酶抑制剂，如 1mM PMSF。
- 3.3、可再利用超声破碎或反复冻融进一步处理(超声破碎过程中，需冰浴降温；反复冻融法可重复 2 次)。
- 3.4、将制备好的匀浆液于 5000×g 离心 5 分钟，留取上清即可检测。或按一次使用量分装冻存于 -20°C 或 -80°C。
- 3.5、根据实验需要，组织匀浆样本可先测定总蛋白浓度，以便于数据分析，推荐 BCA 法。一般调整总蛋白浓度至 1-3mg/ml 用于 ELISA 检测。某些组织样本，如肝脏，肾脏，胰腺因含有较高浓度的内源性过氧化物酶，在样品浓度较高的情况下会和显色底物反应，出现假阳性。可尝试使用 1%H₂O₂ 灭活 15min 再检测。

注意：裂解液常用 PBS 缓冲液，或使用中等强度 RIPA 裂解液。使用 RIPA 裂解液时，PH 值需调整为 PH7.3，避免使用含 NP-40，Triton X-100 和 DTT 的组分，会严重抑制试剂盒工作。推荐使用 50mM Tris+0.9%NaCl+0.1% SDS,PH 7.3，可自行配制或联系我们购买。

4、细胞培养上清

收集上清液，2-8°C，2500rpm 离心 5min，收集澄清的细胞培养上清。立即用于检测，或按一次使用量分装于 -80°C 冻存备用。

5、细胞裂解液

5.1、悬浮细胞的收集及裂解：2-8℃，2500rpm 离心 5min，收集细胞。再加入预冷的 PBS 轻轻混匀清洗，2-8℃，2500rpm 离心 5min，收集细胞。加入 0.5-1ml 细胞裂解液及适量蛋白酶抑制剂(如 PMSF，工作浓度 1mmol/L)，置于冰上，裂解 30min-1h，或者配合超声波破碎。

5.2、贴壁细胞的收集及裂解：吸走上清液，加入预冷的 PBS 洗三次。加入 0.5-1ml 细胞裂解液及适量蛋白酶抑制剂(如 PMSF，工作浓度 1mmol/L)，用细胞刮轻轻刮下贴壁细胞。细胞悬液转入离心管中，置于冰上，裂解 30min-1h，或者配合超声波破碎。

5.3、细胞裂解过程中可用枪头吹打或间断摇动离心管，使蛋白充分裂解，出现黏糊状是 DNA，可以使用超声波破碎 DNA。(或用超声波 3-5mm 探头，功率 150-300W，冰上超声处理样品，工作 1-2 秒，停止 30 秒，3~5 个循环。)

5.4、裂解或超声破碎完成，2-8℃，10000rpm 离心 10min，上清移入 EP 管中，立即用于检测，或按一次使用量分装于-80℃冻存备用。

注意：注意事项同组织样本。

6、其他生物样本

2-8℃，1000×g 离心样品 20 分钟。收集上清液立即用于检测，或按一次使用量分装于-80℃冻存备用。

样本处理相关试剂推荐：100mM PMSF 蛋白酶抑制剂，货号 E051。FineTest Lysis Buffer(for ELISA)，货号：E050。

样品其它注意事项

- 1、收集血液的试管应为一次性无内毒素试管。避免使用溶血，高血脂样品。
- 2、样品最佳保存条件：2-8℃保存应小于 5 天，-20℃不应超过 6 个月，-80℃不应超过 2 年，超过以上时间应保存在液氮中。冻存的标本融化时，为了减少冰晶(0℃)对样品的破坏，应采用 15-25℃水浴快速融化，融化后离心除去沉淀物，混匀后用于检测。
- 3、试剂盒检测范围不等于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
- 4、若所检样本特殊，无参考数据，建议做预实验验证其有效性。
- 5、部分重组蛋白可能与试剂盒中捕获或检测抗体不匹配而出现不能检测的情况。

试剂盒使用注意事项

- 1、使用不同的试剂盒时，需先做好标记，防止组分混用，导致实验失败。
- 2、试剂盒开启后，酶标板和标准品的保存条件请参考组件保存条件表格(受潮后活性会下降)。如发生使用或保存不当导致组件缺损，可申请购买配套组件(如 E002 冻干标准品)。
- 3、请使用无菌一次性吸头吸取试剂，使用后，须旋紧试剂瓶盖，以防止微生物污染和蒸发。
- 4、手工洗板时，加洗液的吸头或滴管，切勿接触酶标板孔。不充分的洗涤或污染容易造成假阳性和高背景。
- 5、检测过程中，请提前准备好下一步实验所需试剂，洗板后及时将试剂加入板孔，防止板孔干燥，导致检测失效。
- 6、在未经确认的情况下，请勿将其他批次试剂盒的试剂或其他来源的试剂用于本试剂盒。
- 7、请勿重复使用一次性吸头，以免造成交叉污染。
- 8、加样完成，贴覆膜以防孵育过程样品的蒸发，在推荐温度下完成孵育过程。
- 9、试验中请穿实验服、戴口罩、手套等，做好防护工作。特别是检测血液或者其他体液样品时，请按国家生物实验室安全防护条例执行。

样品检测数据

以下表格为本试剂盒针对**有限样本**推荐的稀释比例，仅供参考。**(血清/血浆中的基质成分会影响检测结果，需用样品稀释液至少稀释 2 倍(1/2)！其它样品含量很低时，可以原液加样，不稀释，但要确保 pH 在 6.8-8.0 之间，不含有 >10% 的有机溶剂或高浓度蛋白变性剂)**

1、常规样本验证：

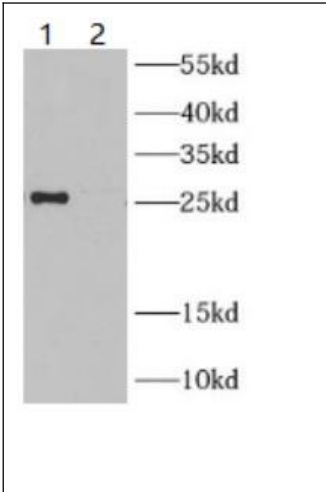
样本类型	推荐稀释比例	参考含量
Healthy human serum/plasma (EDTA, Citrate, heparin) (n=10)	1/2 dilution	ND-6pg/ml
Antigen-positive serum of COVID-19 patients (n=5)	1/2-1/20 dilution	175-856pg/ml
Antigen-positive plasma (EDTA) of COVID-19 patients (n=12)	1/2-1/100 dilution	269-1432pg/ml
Healthy human saliva (n=9)	1/2 dilution	ND-12pg/ml
Human peripheral blood mononuclear cells (2×10^6 cells/mL) were cultured with 5%FBS+ 1640 + double antibody +10ug PHA/ml, and the cell culture supernatant was detected after 48 hours	1/200 dilution	6.9ng/ml

2、KO 样本验证（使用 *IL-6* 基因敲除的 A549 细胞）：

Wild A549 cells were stimulated with 20ng/ml(h.IL-11b) for 24 hours to detect cell culture supernatant	1/40 dilution	1.31ng/ml
KO A549 cells were stimulated with 20ng/ml(h.IL-11b) for 24 hours to detect cell culture supernatants	1/2 dilution	ND
KO A549 cells were treated with 20ng/ml(H.IL-11b) for 24 hours and then cultured with 5ug/ml Brefeldin A (BFA) for 3 hours. Add cell lysis buffer(Catalogue No.:E050), collect the lysate solution (total protein concentration measured by BCA assay: 2.51 mg/ml) to detect.	1/2 dilution	ND

注：ND 为低于试剂盒灵敏度未检测到

3、抗体 WB KO 验证（使用 *IL-6* 基因敲除的 A549 细胞）：

	Lane 1: Wild A549 cells were treated with 20ng/ml(h.IL-11b) for 24 hours, then cultured with 5ug/ml Brefeldin A (BFA) for 3 hours. Add cell lysis buffer (Catalogue No.:E050), collect the lysate solution (total protein concentration measured by BCA assay: 1.37 mg/ml with 5ug total protein loading) to detect. Lane 2: KO A549 cells were treated with 20ng/ml(h.IL-11b) for 24 hours, then cultured with 5ug/ml Brefeldin A (BFA) for 3 hours. Add cell lysis buffer (Catalogue No.:E050), collect the lysate solution (total protein concentration measured by BCA assay: 1.54 mg/ml with 5ug total protein loading) to detect. Primary antibody: All lanes : Capture rabbit monoclonal antibody 1ug/ml Secondary antibody: All lanes : HRP-Goat Anti-rabbit IgG (H) (Catalogue No.: FNSA-0004) at 1/5000 dilution Molecular weight: 25 kDa
---	--

4、通过验证的重组蛋白：（部分蛋白因为标签，序列或者蛋白活性存在差异导致检测信号弱或者检测不到是正常现象）

- A. HEK293-derived human IL-6 protein Val30-Met212
- B. E. coli-derived human IL-6 protein Pro29-Met212
- C. 2nd International Standard for Interleukin-6 21/308

稀释方案推荐

如果您的模型组样本需要其他稀释比例，请参考如下通用稀释方案(此方案为检测不设置复孔的稀释方案。需要设置复孔时，请将样品及稀释液体积 x 复孔数)：

稀释 2 倍(1/2)：一步稀释。取 60ul 样品加入 60ul 样品稀释液中，轻轻混匀。

稀释 5 倍(1/5)：一步稀释。取 24ul 样品加入 96ul 样品稀释液中，轻轻混匀。

稀释 10 倍(1/10)：一步稀释。取 12ul 样品加入 108ul 样品稀释液中，轻轻混匀。

稀释 20 倍(1/20)：一步稀释。取 6ul 样品加入 114ul 样品稀释液中，轻轻混匀。

稀释 50 倍(1/50)：一步稀释。取 3ul 样品及 47ul 生理盐水(即 0.9%氯化钠)加入 100ul 样品稀释液中，轻轻混匀。

稀释 100 倍(1/100)：一步稀释。取 3ul 样品及 177ul 生理盐水加入 120ul 样品稀释液中，轻轻混匀。

稀释 1000 倍(1/1000)：两步稀释，可先稀释 50 倍(此步骤全使用生理盐水稀释)，再稀释 20 倍。轻轻混匀。

稀释 10000 倍(1/10000)：两步稀释，可先稀释 100 倍(此步骤全使用生理盐水稀释)，再稀释 100 倍。轻轻混匀。

稀释 100000 倍(1/100000)：三步稀释，可先稀释 50 倍，再稀释 20 倍(前两步全使用生理盐水稀释)，最后稀释 100 倍。轻轻混匀。

注意 1：每步稀释时取液量不少于 3ul，稀释倍数不超过 100 倍。每步稀释都需混合均匀，避免起泡。

2：细胞培养上清所含有的目的蛋白浓度受细胞类型、细胞密度和培养环境所影响。部分炎症因子在不同浓度和不同种类的化学物质（如 LPS，PHA 等）刺激下，表达情况存在巨大差异。案例发现有的细胞刺激后能达到 12ug/ml TNF- α 和 >70ng/ml 的 IL-6。因此实验者需进行预实验来摸索细胞培养上清样品的最佳稀释比。若不确定含量，建议 1/2、1/10、1/100、1/1000、1/10000 等跨度较大的稀释比。如样品浓度非常高，需稀释更多倍才能适应试剂盒的检测范围。

检测前试剂准备

提前 20 分钟从冰箱中取出试剂盒，平衡到室温(18-25°C)。如果试剂盒需分多次使用，请仅取出本次实验所需的酶标板条及标准品，剩余酶标板条和标准品需按指定条件保存。

1、洗液:

用去离子水或蒸馏水(推荐电阻率为 18MΩ 的超纯水)将 30ml 浓缩洗涤液(48T 为 15ml)稀释至 750ml(48T 为 375ml)并混匀。或依实验所需，取适量浓缩洗涤液稀释至 25 倍体积并混匀，将未使用的溶液放回 2-8°C。

如果浓缩的洗涤液中形成了晶体，可以在 40°C 水浴中加热(加热温度不应超过 50°C)，直至晶体完全溶解，混匀后使用。

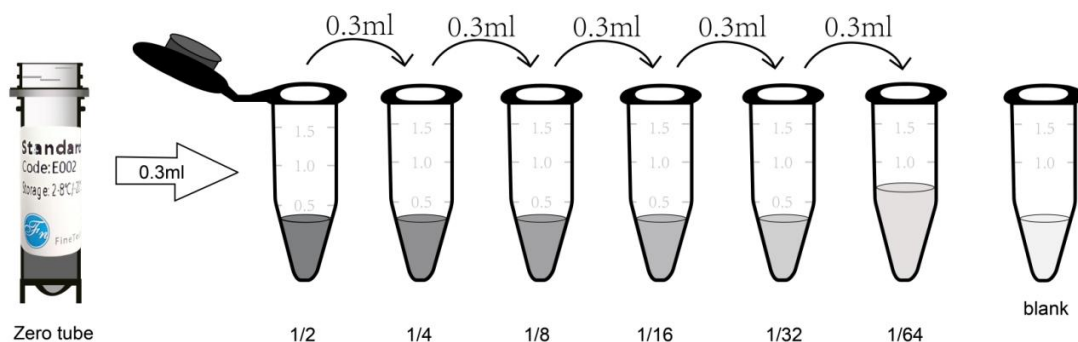
配制好的洗液，最好当天使用完，用不完的，可以保存在 2-8°C，不超过 48 小时。

2、标准品:

2.1、将冻干标准品管于 10000×g 离心 1 分钟。标记为 Zero tube.

2.2、取 1ml 样品稀释液加入冻干标准品管中，旋紧管盖，室温静置 2 分钟，上下颠倒数次轻轻混匀(或加入 1ml 样品稀释液，静置 1-2 分钟后，用低速涡旋仪混匀 3-5 秒)。1000×g 低速离心 1 分钟，将液体收集至管底。

2.3、梯度稀释：另取 7 个 EP 管，分别标记为 1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64 和 blank。先在每个 EP 管中分别加入 0.3ml 的样品稀释液。再取 0.3ml Zero tube 标准品溶液加入到 1/2 管中，充分混合。再取 0.3ml 1/2 管标准品溶液到 1/4 管中，充分混合。再取 0.3ml 1/4 管标准品溶液到 1/8 管中，充分混合，依此类推。注意 Blank EP 管中仅有样品稀释液。此时，从 Zero tube 管到 blank 管这 8 个 EP 管中标准品的浓度分别为 300pg/ml, 150pg/ml, 75pg/ml, 37.5pg/ml, 18.75pg/ml, 9.375pg/ml, 4.688pg/ml, 0pg/ml。



Prepare standard solutions

注: 已溶解的零号管标准品，请保存于 2-8°C，并在 12 小时内使用。已稀释过的其他梯度标准品工作液请于 2 小时内使用。

3、生物素-抗体工作液:

实验前 30 分钟内准备好，现用现配，不适合长期存放。

3.1、计算所需工作液的总体积：100ul/孔×孔数。(最好准备比总体积多 100ul-200ul 的量)

3.2、1000×g 低速离心 1 分钟，将浓缩生物素-抗体收集至管底。

3.3、用抗体稀释液按 1/100 的比例稀释浓缩生物素-抗体，充分混匀。(如将 10ul 浓缩生物素-抗体加入 990ul 抗体稀释液中)

4、HRP-链霉亲和素(SABC)工作液:

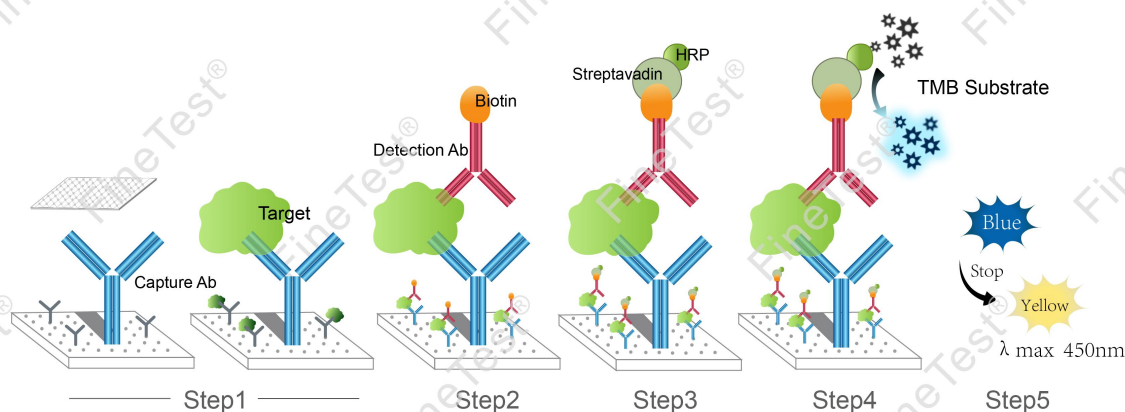
实验前 30 分钟内准备好，现用现配，不适合长期存放。

4.1、计算所需工作液的总体积：100ul/孔×孔数。(最好准备比总体积多 100ul-200ul 的量。)

4.2、1000×g 低速离心 1 分钟，将浓缩 SABC 收集至管底。

4.3、用 SABC 稀释液按 1/100 的比例稀释浓缩 SABC，充分混匀。(如将 10ul 的浓缩 SABC 加入 990ul SABC 稀释液中)

操作步骤概要



步骤 1: 向孔中加入 100ul 标准品或待测样品，贴上覆膜，37°C 静置孵育 90 分钟。

洗板: 洗板 2 次。不浸泡。

步骤 2: 加入 100ul 生物素-抗体工作液，贴上覆膜，37°C 静置孵育 60 分钟。

洗板: 洗板 3 次。每次浸泡 1 分钟。

步骤 3: 加入 100ul HRP-链霉亲和素(SABC)工作液，贴上覆膜，37°C 静置孵育 30 分钟。

洗板: 洗板 5 次。每次浸泡 1 分钟。

步骤 4: 添加 90ul TMB 显色底物。贴上覆膜，37°C 静置孵育 10-20 分钟(请使用 TMB 显色精准控制方法)。

步骤 5: 添加 50ul 反应终止液。立即在 450nm 处读取 OD450 值并计算。

详细操作步骤

稀释样品和试剂时，需将它们完全混合。建议每次测试都绘制标准曲线。

- 1、设定标准品孔、样品孔、空白孔，并记录其位置。为减小实验误差，建议将标准品和样品设置复孔。
- 2、**加样:** 向标准品孔中加入 100ul 各梯度标准品，向样品孔中加入 100ul 适度稀释的待测样品，向空白孔中加入 100ul 样品稀释液。贴上覆膜，并在 37°C 静置孵育 90 分钟。(将溶液添加到微孔板的底部，轻轻晃动混匀，并尽可能避免接触管壁和起泡，**严禁在孔中反复吹吸混合。**)
- 3、**洗板 2 次:** 取下覆膜，吸去或甩掉酶标板内的液体，在洁净的吸水纸上拍 2-3 次。每孔加入洗涤缓冲液 350ul，不浸泡，弃掉孔内液体，在吸水纸上拍 2-3 次。重复此洗板步骤 2 次。
- 4、**加生物素-抗体工作液:** 向每孔加入 100ul 生物素-抗体工作液。贴上覆膜，37°C 静置孵育 60 分钟。
- 5、**洗板 3 次:** 取下覆膜，吸去或甩掉酶标板内的液体，在洁净的吸水纸上拍 2-3 次。每孔加入洗涤缓冲液 350ul，浸泡 1 分钟，弃掉孔内液体，在吸水纸上拍 2-3 次。重复洗板步骤 3 次。
- 6、**加 HRP-链霉亲和素(SABC):** 向每孔加入 100ul SABC 工作液。贴上覆膜，37°C 静置孵育 30 分钟。(同时将整瓶 TMB 放入 37°C 温箱中平衡)
- 7、**洗板 5 次:** 取下覆膜，用洗涤缓冲液洗板 5 次，方法参考步骤 5。
- 8、**加 TMB 显色底物:** 向每孔加入 90ul TMB 显色底物，贴上覆膜，在 37°C 避光静置孵育 10-20 分钟。打开酶标仪预热 15min。(注意：不可使用配制 HRP 偶联物的加样槽。显色根据颜色的实际变化，反应时间可以缩短或延长，但不能超过 30 分钟。当标准孔中出现较好的蓝色梯度时，可以终止反应。显色强度不易太弱或过强，精准控制显色方法请查阅说明书第二页相关文件及二维码)
- 9、**加反应终止液:** 显色后，孔内液体不可弃掉，向每孔加入 50ul 反应终止液。颜色将由蓝色立即变为黄色。添加终止液的顺序与添加 TMB 底物的顺序相同。

- 10、**OD 值的测量：**立即用酶标仪在 450nm 处读取 OD450 数值。（如果您的酶标仪有可以选择的校正波长，则设置为 570nm 或 630nm。校正读数值为 OD450 的值减去 OD570 或 OD630 的值。这种方式可以校正并去除非显色物质的 OD 值，从而获得更准确的检测结果。如果酶标仪没有 570nm 或 630nm 波长，则可使用原始 OD450 值。）

结果计算

（操作视频：<https://www.fn-test.cn/videos/standard-curve-drawing-video-in-elisa-kit/>）

- 1、取标准品和样品复孔的平均 OD450 值（使用原始 OD450 值或校正读数值），再减去空白孔的 OD450 值，作为计算值。
- 2、以浓度为横坐标，OD450 值为纵坐标，可使用四参数方程 4PL 绘制标准曲线(作图时去掉空白孔的值)。也可使用酶标仪自带的作图软件(如 Thermo FC 型号酶标仪 SkanIt RE 软件)，或 Curve Expert 1.3 or 1.4 专业软件(本公司网站可以免费下载使用)绘制标准曲线。
- 3、将样本的 OD450 值代入标准曲线，即可计算得到样品的浓度值。如果样品被稀释过，则需乘以相应的稀释倍数。

不同方法绘制标准曲线的说明

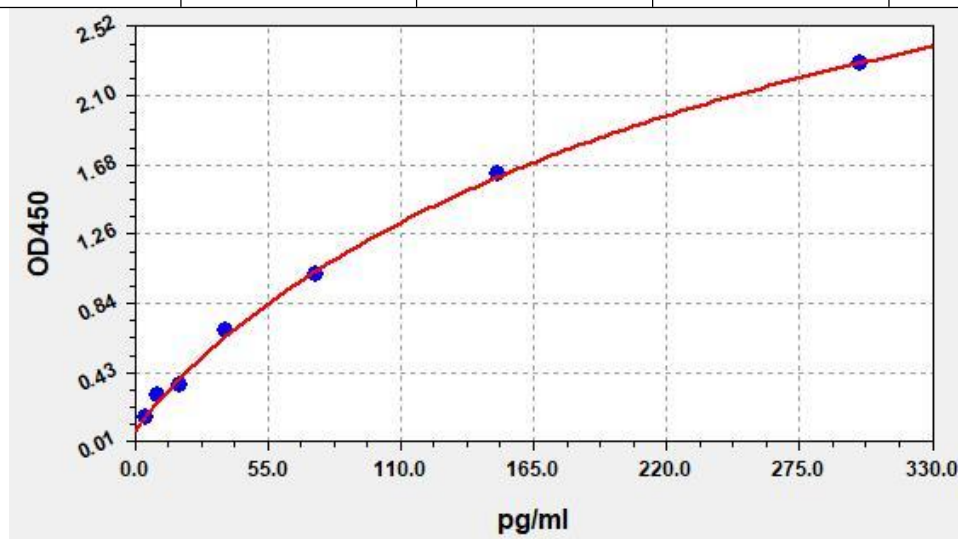
- 1、线性图：一个坐标轴表示抗原的浓度，另一个表示读数 OD450 值。 R^2 值在此通常用于确定拟合，数值大于 0.99 表示拟合非常好。然而，线性图往往会压缩曲线下端上的数据点，导致计算结果不准确。
- 2、半对数图：帮助抵消线性图引起的下端压缩。半对数图使用浓度的对数与读数的关系。这种方法通常会得到数据点分布更均匀的 S 形曲线。
- 3、对数/双对数图：为低到中浓度范围提供良好的线性。但范围的高端则容易失去线性。
- 4、四或五参数方程(4PL 或 5PL)曲线：方法更复杂，考虑了其他参数，比如最大值和最小值，因此需要更复杂的计算。4PL 假设拐点周围对称，而 5PL 考虑了不对称的情况，通常更适合免疫分析。如果您的软件允许，则 4-PL 和 5-PL 将适用于大部分 ELISA 校正标准曲线。

实验数据及标准曲线

本产品经品管部检测，符合使用手册的性能要求。(实验室湿度为 20%-60%，温度为 18°C -25°C。显色前将 TMB 平衡至 37°C，加入酶标板孔后，37°C 避光孵育 15 分钟。)

因具体实验环境及操作存在差异，以下实验数据和标准曲线仅供参考，实验人员需根据自己的实验建立标准曲线。

STD.(pg/ml)	OD-1	OD-2	Average	Corrected
0	0.067	0.07	0.068	0
4.688	0.154	0.16	0.157	0.089
9.375	0.283	0.295	0.289	0.221
18.75	0.349	0.363	0.356	0.288
37.5	0.665	0.692	0.678	0.61
75	0.999	1.04	1.019	0.951
150	1.591	1.656	1.624	1.556
300	2.251	2.343	2.297	2.229



精密度

板内精密度：低、中、高浓度样本分别在同 1 块酶标板上检测 20 次。

板间精密度：低、中、高浓度样本分别在 3 块酶标板上检测 20 次。

类别	板内变异系数			板间变异系数		
	1	2	3	1	2	3
样本	1	2	3	1	2	3
数量	20	20	20	20	20	20
平均值(pg/ml)	9.64	37.26	153.2	9.17	37.94	147.6
标准差	0.52	1.74	7.22	0.42	1.76	6.85
变异系数(%)	5.35	4.66	4.71	4.62	4.64	4.64

回收率

将一定含量的 IL-6 加入样本中，并通过将测量值与样品中 IL-6 的预期量进行比较来计算回收率。

样品类型	回收率范围 (%)	平均回收率 (%)
血清(n=10)	87-105	99
EDTA 血浆(n=10)	86-101	96
肝素血浆(n=10)	92-100	95

线性

将添加有适当浓度 IL-6 的样品分别稀释 2 倍、4 倍、8 倍来检测，得出回收率范围。

样品类型	1:2	1:4	1:8
血清(n=10)	91-104%	82-101%	81-98%
EDTA 血浆(n=10)	87-104%	82-94%	89-100%
肝素血浆(n=10)	90-102%	87-100%	84-93%

稳定性

未拆封的试剂盒在 37°C 和 2-8°C 进行稳定性实验，得出稳定性数据。

试剂盒(n=5)	37°C 一个月	2-8°C 六个月	2-8°C 十二个月
平均值 (%)	80	95-100	85-98

ELISA 疑难解答提示

若实验结果不理想，请及时将显色结果拍照并保存实验数据，保留所用板条及未使用试剂。凭试剂盒盒面货号及批次号，联系我公司销售人员为您解决问题。同时您也可以参考以下表格自查原因：

问题描述	可能原因	相应对策
标准曲线无信号	检测试剂加样顺序不对	确认各步骤所加试剂正确，可重做一次并确认
	混淆了不同试剂盒的组件	使用试剂盒本身的各组件，可重做一次并确认
	漏加试剂	确认试剂是否添加
标准曲线显色过强	混淆了不同试剂盒的组件，或配置工作液浓度过高	使用试剂盒本身的各组件，可重做一次并确认
标准曲线图形不好	曲线选择不恰当	尝试使用不同方法绘制曲线
样品无信号	待测样品含量低于测定的检测限	减小稀释倍数或浓缩样品
	目的物和缓冲液的相容性不好	确保样品储存缓冲液与待测样品相容性
	样品制备不正确	参考样品制备指南并规范保存
	样品保存时间过久或反复冻融	按一次使用量分装并规范保存
变异系数 (CV) 较大	显色时在孔中形成沉淀	增大样品的稀释倍数
	酶标板不干净	实验时勿碰触酶标板底部
	孔中有气泡	确保酶标板读数时孔中无气泡
	板孔洗涤不均	检查洗板机的管口是否畅通
	试剂未混匀	所有试剂已充分混合
	移液量不一致	使用校准好的移液器和正确的移液方法
标准曲线信号弱	标准品复溶不当	开盖前短暂离心冻干标准品管；检查是否溶解完全
	标准品已降解	按推荐方式保存标准品
	移液体积出错或不准	使用校准好的移液器和正确的移液方法
	试剂盒过期	不使用过期产品
	试剂盒保存不当	按说明书要求保存各组分
	板孔过分干燥	检测及加样过程不可中断。尤其洗板之后，需及时加入试剂。孵育时，贴覆膜。
	酶反应显色慢	每次使用前将整瓶 TMB 显色底物在 37°C 平衡 30min。延长孵育时间
	酶标仪波长不正确	核实波长并重新读取 OD450 值
	板孔清洗过度	按说明书描述的洗板次数
背景高	未彻底洗涤	按说明书描述的洗板次数

	洗涤缓冲液受污染	洗涤液现用现配，手工洗板悬空加洗液，不触及板孔
	检测试剂过多，或配置浓度过高	使用校准好的移液器和正确的移液方法
	终止后读数不及时	加入终止液后立即读数
	TMB 底物孵育在强光下进行	显色时避光孵育

声明

- 1、限于现有条件及科学技术水平，尚不能对所有原料进行全面的鉴定分析，本产品可能存在一定的质量技术风险。
- 2、本试剂盒在研发过程中去除/降低了生物学样本中的一些内源性干扰因素，并非所有可能影响的因素均已去除。
- 3、最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及当时的实验环境等因素密切相关，本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，请使用者使用前充分考虑到样本可能的使用量，预留充足的样本。
- 4、为了达到好的实验结果，请只使用本公司试剂盒内提供的试剂，不要混用其他制造商的产品，严格按照说明书操作。
- 5、由于操作过程中试剂制备以及酶标仪参数设置不正确，可能导致结果异常，实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器。
- 6、即使是相同人员操作也可能在两次独立实验中得到不同的结果，为保证结果的重现性，需要控制实验过程中每一步的操作。
- 7、试剂盒发货前会经过严格的质检，然而，因为运输条件、实验设备差异等等因素影响，用户检测结果可能跟出厂数据不一致。不同批次间试剂盒间的差异也可能来自上述原因。
- 8、本试剂盒未与其他厂家同类试剂盒或不同方法检测同一目的物的产品进行对比，所以不排除检测结果不一致的情况。
- 9、试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。