

# Human IL-9 ELISA 试剂盒说明书

Catalog #: DKW12-1090

## 产品描述:

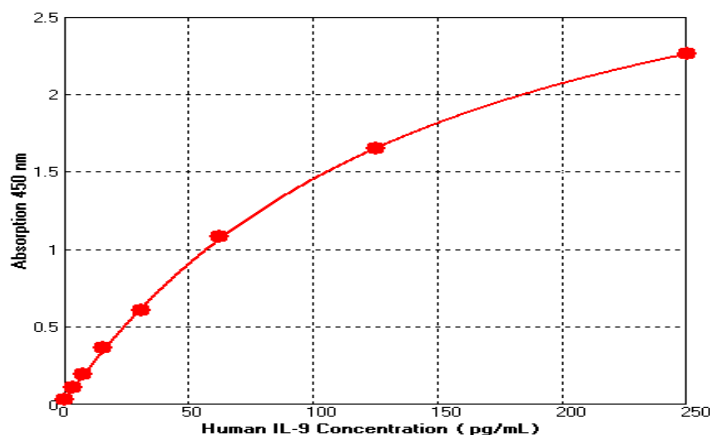
人 IL-9 ELISA 试剂盒是通过酶联免疫吸附技术，体外定量检测人血清、血浆、缓冲液或细胞培养液中的人 IL-9。本试剂盒专用于科研，而非用于诊断。使用前请仔细阅读说明书并检查试剂盒组分，若有任何疑问请与深圳市达科为生物工程有限公司联系，

E-mail: RD@dakewe.com.

检测范围: 250-3.9 pg/mL

灵敏度: 2 pg/mL

重复性: 板内、板间变异系数均 &lt; 10%。



注意: 本图仅供参考, 应以同次实验标准品所绘标准曲线来计算标本含量。

## 试剂盒组分:

| 组分                    | 规格          | 配制                                |
|-----------------------|-------------|-----------------------------------|
| Cytokine standard     | 2/1 瓶*      | 干粉状, 按瓶上说明稀释                      |
| Biotinylated antibody | 2/1 管*      | 1 : 100 用 Dilution buffer R(1×)稀释 |
| Streptavidin-HRP      | 2/1 管*      | 1 : 100 用 Dilution buffer R(1×)稀释 |
| Dilution buffer R(1×) | 3/2 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 或 8×6* | 即用型                               |
| 封板膜                   | 2/1 张*      | 即用型                               |
| 说明书                   | 1 份         |                                   |

\*: 96 /48 Tests

## 自备物品:

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, 全新滤纸
4. 旋涡振荡器和磁力搅拌器

## 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, 按瓶上说明溶解干粉, **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) 再配制成为 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。

深圳市达科为生物工程有限公司 地址: 深圳市南山区西丽桃源街道光前工业区 20 栋 4 楼 C 区 邮编: 518055

Tel: 800 830 4366/0755-86235300 Fax: 0755-86235303 Web: www.dakewe.com E-mail: RD@dakewe.com

1/4

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**孵育为好。
13. 试剂盒在保质期内使用，且不同批号试剂不要混用。250 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 250 pg/mL Human IL-9 的样品应以标准稀释缓冲液稀释后重做。在结果分析时，结合考虑相应的稀释度。
14. 特异性：不与人其它细胞因子反应。

### 检测前准备：

1. **Cytokine standard:** 外观为冻干粉,先按标签说明将冻干粉溶解，再用 **Dilution buffer R (1×)** 进行倍比稀释。稀释前将标准品轻轻振荡 5 分钟。
  - \* **建议使用标准品浓度梯度为：** 250 pg/mL、125 pg/mL、62.5 pg/mL、31.3 pg/mL、15.6 pg/mL、7.8 pg/mL、3.9 pg/mL。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。
2. **Biotinylated antibody:** 1:100 用 Dilution buffer(1×)稀释，混匀制成 **Biotinylated antibody 工作液**。
3. **Streptavidin-HRP :** 1:100 用 Dilution buffer(1×)稀释，混匀制成 **Streptavidin-HRP 工作液**。
4. **Washing buffer(50×):** 1 : 50 用蒸馏水稀释。
5. 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**

### 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。样品（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 加入样品至样品孔，100 μL/well 加入 Dilution buffer R (1×) 至空白对照孔。盖上封板膜，室温（18-25℃）孵育 2 小时。
4. **洗板：**扣去孔内液体，300 μL/well 加入 1×washing buffer 工作液；停留 1 分钟后弃去孔内液体。重复 3 次，最后一次在滤纸上扣干。
5. **加检测抗体：**100 μL/well 加入 Biotinylated antibody 工作液。盖上封板膜，室温（18-25℃）孵育 1 小时。
6. **洗板：**重复步骤 4。
7. **加酶：**100 μL/well 加入 Streptavidin-HRP 工作液。盖上封板膜，室温（18-25℃）孵育 30 分钟。
8. **洗板：**重复步骤 4。
9. **显色：**100 μL/well 加入 TMB，室温避光孵育 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。
10. **终止反应：**迅速 100 μL/well 加入 Stop solution 终止反应。
11. **读板：**终止后 10 分钟内，用检测波长（measurement wavelength）450 nm 读值。若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。

### 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。

## 操作步骤一览表

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

室温孵育 2 小时; 洗板 3 次

加 **Biotinylated antibody** 工作液, **100  $\mu$ L/well**

室温孵育 1 小时; 洗板 3 次

加 **Streptavidin-HRP** 工作液, **100  $\mu$ L/well**

室温孵育 30 分钟; 洗板 3 次

加 **TMB** 显色液, **100  $\mu$ L/well**

室温避光显色 5-30 分钟

加 **Stop solution** **100  $\mu$ L/well**, 终止反应

10 分钟内读板

在  $\lambda=450\text{ nm}$  处读取吸光值

## 参考文献:

- (1) Demoulin J B, et al. Distinct roles for STAT1, STAT3, and STAT5 in differentiation gene induction and apoptosis inhibition by interleukin9. J Biol Chem, 1999, 274: 25855-25861.
- (2) Gessner A. Differential regulation of IL-9 expression after infection with Leishmania major in susceptible and resistant mice. Immunobiology, 1993, 189: 419-435.

附：

## 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；<br>(2) 显色反应时间太短；<br>(3) 配制缓冲液的蒸馏水有问题；<br>(4) 加入抗体/酶的稀释液浓度太低；<br>(5) 酶标仪滤光片不正确；<br>(6) 不正确的试剂储存方式；<br>(7) 试剂盒没有充分平衡；<br>(8) 移液器吸液量不足，吸嘴内壁挂水太多或内壁不清洁。                                                                                       | 校正温育箱温度；校正定时钟准确定时；使用新鲜合格的蒸馏水；按照说明书保存试剂盒和准确配制工作液；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℃）；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<br>(1) 加样本及试剂量不准；孔间不一致；<br>(2) 加样过快，孔间发生污染；<br>(3) 加错样本；<br>(4) 加样本及试剂时，加在孔壁上部非包被区；<br>(5) 不同批号试剂盒中组分混用；<br>(6) 温育时间、洗板、显色时间不一致；<br>(7) 孔内污染杂物；<br>(8) 酶标仪滤光片不正确；<br>(9) 试剂/样本没有混匀；<br>(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。 | 重复某一样本时，加样时间尽可能与第一次接近；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；样本稀释前应充分混匀；尽可能使用同一移液器并装紧吸嘴。                                           |
| 3. 白板<br><br>(阳性对照不显色) | (1) 漏加酶结合物；<br>(2) 洗板液配制中出现错误，如量筒不干净，含酶抑制物（如叠氮钠）等；<br>(3) 添加的试剂错误或者被遗漏；<br>(4) 试剂过期；                                                                                                                                                                      | 请按说明书所示稀释倍数配制；注意不要漏加；每次加液前均应核对标签。                                                                                                        |
| 4. 空白背景高               | (1) 洗板不干净；<br>(2) 显色液变质；<br>(3) 试剂过期；<br>(4) 试剂配制浓度有误，如酶的浓度过高；<br>(5) 蒸馏水受酶等污染；<br>(6) 试剂混用；<br>(7) 培养箱温度超过 37℃ 或反应时间过长。                                                                                                                                  | 浓缩洗液准确配制；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；充分洗涤，彻底拍干；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；吸嘴尽可能一次性使用；使用新鲜蒸馏水；不同批号试剂勿混用；请按说明书所示稀释倍数配制；显色反应时间适当缩短。 |

(1701)