

产品说明书

Mouse IL-10 ELISA Kit

abs520005

概述

别名

CSIF, CSIFMGC126450, Cytokine synthesis inhibitory factor, GVHDS, IL10, IL-10, IL10A, IL-10MGC126451, interleukin 10, interleukin-10, TGIF

检验原理

本试剂盒采用双抗体夹心酶联免疫吸附检测技术。特异性抗小鼠IL-10抗体预包被在高亲和力的酶标板上。酶标板孔中加入标准品、待测样本和生物素化的检测抗体，经过孵育，样本中存在的IL-10与固相抗体和检测抗体结合，形成免疫复合物。洗涤去除未结合的物质后，加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素（Streptavidin-HRP）。洗涤后，加入显色底物，避光显色。加入终止液终止反应，在450nm波长（参考校正波长540nm或570nm）测定吸光度值。

产品组成

请在试剂盒有效期内使用

组成	规格	拆封后，稀释或重溶的试剂有效期
Mouse IL-10 Microplate	1块	将未使用的板条放回带有干燥剂的铝箔袋中密封后，可在2-8℃储存30天
Mouse IL-10标准品	2支	溶解后，计算用量分装，可在-20° C储存14天
Mouse IL-10检测抗体	1支	浓缩体积溶解后，可在2-8° C储存14天
40×SA-HRP	1支	40×浓度可在2-8° C储存；1×工作浓度不建议保存
10×浓缩稀释用缓冲液	1瓶	开封后，可在2-8° C储存30天
显色液	1瓶	
终止液	1瓶	
20×浓缩洗涤缓冲液	1瓶	
封板膜	3张	常温储存，为避免污染，不可重复使用

反应种属

Mouse

检测范围

31.3pg/mL-2000pg/mL

使用方法

需自备试验器材

1. 酶标仪（可测量450nm检测波长的吸收值及540nm或570nm校正波长的吸收值）
2. 高精度加液器及一次性吸头
3. 蒸馏水或去离子水
4. 洗瓶（喷瓶）、多通道洗板器或自动洗板机
5. 500mL量筒

产品说明书

一、实验前准备

1. 样品收集及储存

①细胞培养上清: 颗粒物应通过离心去除; 立刻检测样本。样本收集后若不及时检测, 建议按一次使用量分装, 冻存于-20℃冰箱内, 避免反复冻融。样本可能需用稀释剂(1×)稀释。

②血清: 使用血清分离管(SST)收集样本, 样品室温放置30分钟。离心15分钟, 转速为1000g。立即取出血清, 并立即检测。样本收集后若不及时检测, 建议按一次使用量分装, 冻存于≤-20℃冰箱内, 避免反复冻融。样本可能需用稀释剂(1×)稀释。

③血浆: 使用EDTA、肝素或柠檬酸作为抗凝血剂收集血浆, 在收集后30分钟内离心15分钟, 转速为1000g, 并立即检测。样本收集后若不及时检测, 建议按一次使用量分装, 冻存于≤-20℃冰箱内, 避免反复冻融。样本可能需用稀释剂(1×)稀释。

2. 试剂配制 (使用前请将所有试剂和样本放置于室温, 静置 15 分钟。建议所有的实验样本和标准品做复孔检测)

①1×洗涤液配制: 试剂盒中的浓缩洗涤液为20×母液, 使用前需使用蒸馏水稀释为1×工作液。**例:** 取10mL浓缩洗涤液+190mL蒸馏水定容至200mL, 实际操作时可先计算使用量, 再进行配制。

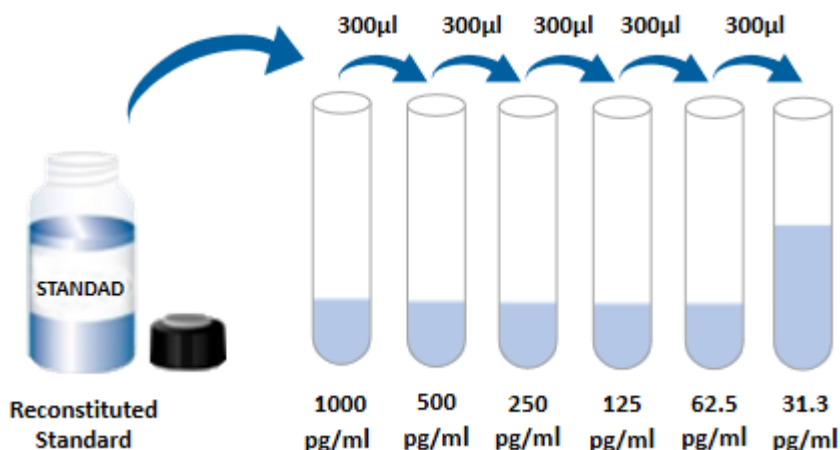
②1×稀释用缓冲液配制: 试剂盒中的浓缩稀释用缓冲液为10×母液, 使用前需使用蒸馏水稀释至1×工作液。**例:** 取3mL浓缩稀释用缓冲液+27mL蒸馏水定容至30mL。实际操作时可先依据样本稀释倍数, 计算所需的稀释用缓冲液用量, 再进行配制。

③检测抗体: 将干粉离心至管底, 使用110uL稀释用缓冲液(1×)溶解, 室温静置5分钟后得到100×母液; 使用前需稀释为1×工作液。按照每孔用量100uL计算所需体积。**例:** 使用了10个孔, 则取10uL的100倍工作浓度的检测抗体, 使用稀释用缓冲液(1×)定容至1mL, 得到1mL的1×工作浓度的检测抗体。

④SA-HRP: SA-HRP为40×母液, 使用前需使用稀释缓冲液(1×)稀释配制成1×工作液, 每孔所需量为100uL。**例:** 使用了10个孔, 则取25uL的40×母液+975uL稀释用缓冲液(1×)定容至1mL, 得到1mL的1×工作浓度的检测抗体。

⑤显色剂: 按每孔100uL, 计算当次试验所需要用量, 取出相应体积的显色剂, 避光; 取出的显色剂仅供当日使用。

⑥标准品: 冻干标准品用稀释用缓冲液(1×)重溶, 重溶体积1000uL, 得到浓度为2000pg/mL标准品母液。轻轻震荡至少5分钟, 其充分溶解。每个稀释管中加入300uL稀释用缓冲液(1×)。将标准品母液参照下图做系列稀释, 每管须充分混匀后再移液到下一管。没有稀释的标准品母液可用作标准曲线最高点(2000pg/mL), 稀释用缓冲液(1×)可用作标准曲线零点(0pg/mL)。



二、操作步骤

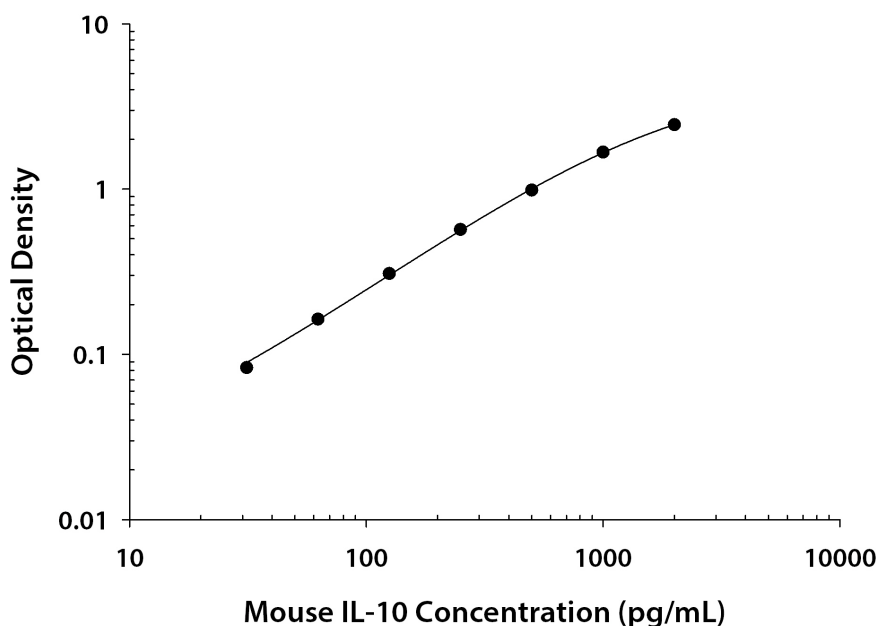
1. 准备好所有需要的试剂和标准品;

2. 从已平衡至室温的密封袋中取出微孔板, 未用的板条请放回铝箔袋内, 重新封口;

3. 向微孔板中加入300uL洗涤液, 静置浸泡30秒, 弃掉洗液在吸水纸上将微孔板拍干, 请立即使用不要让微孔板干燥;

产品说明书

4. 分别将不同浓度标准品, 实验样本或者质控品加入相应孔中, 每孔100uL。用封板胶纸封住反应孔, 室温孵育2小时;
5. 将板内液体吸去, 使用洗瓶、多通道洗板器或自动洗板机洗板。每孔加洗涤液300uL, 然后将板内洗涤液吸去。重复操作3次。每次洗板尽量吸去残留液体会有助于得到好的实验结果。最后一次洗板结束, 请将板内所有液体吸干或将板倒置, 在吸水纸拍干所有残留液体;
6. 在每个微孔内加入100uL检测抗体。用封板胶纸封住反应孔, 室温孵育2小时;
7. 重复第5步洗板操作;
8. 在每个微孔内加入100uLSA-HRP, 室温孵育20分钟。注意避光;
9. 重复第5步洗板操作;
10. 在每个微孔内加入100uL显色液, 室温孵育5-30分钟, 注意避光;
11. 在每个微孔内加入50uL终止液, 孔内溶液颜色会从蓝色变为黄色。如果溶液颜色变为绿色或者颜色变化不一致, 请轻拍微孔板, 使溶液混合均匀;
12. 加入终止液后30分钟内, 使用酶标仪测量450nm的吸光度值, 设定540nm或570nm作为校正波长。如果没有使用双波长校正, 结果准确度可能会受影响;
13. 计算结果: 将每个标准品和样品的校正吸光度值(OD₄₅₀-OD₅₄₀或OD₅₇₀)、复孔读数取平均值, 然后减去平均零标准品OD值。使用计算机软件作四参数逻辑(4-PL)曲线拟合创建标准曲线。另一种方法是, 可以通过绘制标准品浓度做对数与相应OD值对数生成曲线, 并通过回归分析确定最佳拟合线。这个过程可生成一个足够使用但不太精确的数据拟合。若样本经过稀释, 计算浓度时应乘以稀释倍数。



注: 提供的标准曲线数据仅供参考, 应根据同次试验所绘标准曲线计算样本含量。

三、试剂盒参数

1. 回收率: 在细胞培养基样本中掺入不同水平的Mouse IL-10, 测定其回收率。回收率范围在95-103%, 平均回收率在 99%。
2. 灵敏度: Mouse IL-10的最低可测剂量(MDD)一般在1.8pg/mL。最低可测值是根据20个标准曲线零点吸光值的平均值加两倍标准差计算得到的相对应浓度。
3. 校正: 此 ELISA 试剂盒经大肠杆菌表达的高纯度重组Mouse IL-10蛋白所校正。
4. 线性: 4个不同的样本中掺入高浓度的Mouse IL-10, 然后用稀释剂(1×)将样本稀释到检测范围内, 测定其线性。

产品说明书

稀释倍数	平均值/期待值 (%)	范围 (%)
1:2	93	90-94
1:4	90	85-94
1:8	89	84-96
1:16	87	84-92

5. 特异性：此ELISA法可检测天然及重组Mouse IL-10蛋白。将以下因子用稀释剂（1×）配置成50ng/mL的浓度来检测与Mouse IL-10的交叉反应。将50ng/mL的干扰因子掺入中间范围的重组Mouse IL-10对照品中，来检测对Mouse IL-10的干扰。没有观察到明显的交叉反应或干扰。含浓度 31.3ng/mL 的重组Mouse IL-10 有 1.5%交叉反应性。

重组人蛋白	重组小鼠蛋白
IL-10	IL-10R
IL-10R	

四、常见问题解析

1. 白板（显色完成后，无颜色出现）

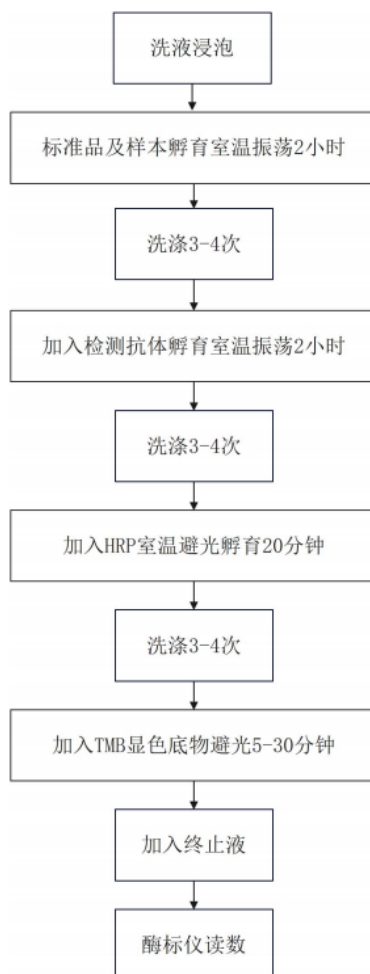
序号	可能原因	解决方案
1	试剂盒储存不当；不同试剂盒试剂混用	购买新试剂盒，注意储存条件；不可混用
2	赋予温度低，时间短	如果温度偏低，则延长孵育时间和显色时间
3	错加、漏加试剂	严格按照说明书步骤添加正确试剂
4	用于配置溶液的容器不干净，或水有问题	使用干净容器以及合格的蒸馏水
5	洗板过程中浸泡时间长，洗板次数太多，洗板冲击力大	严格按照说明书操作
6	试剂温度不均一	所有试剂要室温平衡30分钟
7	检测抗体和/或HRP浓度太低	参照说明书，不可随意稀释

2. 花板（空白、阴性阳性对照正常，但标本孔OD值明显偏高）

序号	可能原因	解决方案
1	洗涤次数少，不充分	按照说明书要求洗涤
2	底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺（TMB）被金属离子或氧化剂污染或曝光	配制时使用干净容器以及合格的蒸馏水；避光保存
3	孵育温度高和/或时间过长	控制孵育和最后酶促反应的温度和时间
4	加样时未更换枪头，造成交叉污染	每个样都更换枪头
5	附近孔交叉污染	垂直拍板，使用合适的拍板纸，避免孔内进入纸屑
6	样本存在内源性干扰物质	推测可能的感染物质，并进行对应处理
7	样本溶血、贮存过久、凝集不全、被细菌污染、采血管中添加物影响	避免溶血、污染、过久储存等现象

产品说明书

五、实验流程图



背景说明

小鼠白细胞介素-10（IL-10）又称为细胞因子合成抑制因子（CSIF）。它是IL-10 α -螺旋细胞因子家族的成员之一，该分子家族中还包括IL-19、IL-12、IL-22、IL-24以及IL-26/AK155。许多激活的造血干细胞、肝脏星状细胞、角质化细胞和胎盘细胞滋养层均分泌IL-10。人IL-10在小鼠细胞中具有活性，但小鼠IL-10却不作用于人类细胞。成熟小鼠IL-10与大鼠IL-10的氨基酸同源率为85%，与牛、犬、马、猫、人、羊、猪的氨基酸同源率为70~77%。成熟小鼠IL-10是一个分子量为36kDa的非共价结合的同源二聚体，含有两个链内二硫键。

IL-10通过由II型细胞因子受体IL-10 R α 和IL-10 β 组成的异聚体受体复合物发挥其生物活性。IL-10 R α 是一个110kDa的跨膜糖蛋白，在淋巴细胞、天然杀伤细胞、巨噬细胞、单核细胞、星形胶质细胞、肠上皮细胞、细胞滋养层以及活化的肝星状细胞中表达，而75kDa的IL-10 R β 却在生物体内广泛表达。IL-10二聚体先结合两个IL-10 R α 链，进一步结合两个IL-10 R β 链。IL-10 R β 不直接与IL-10结合，但参与信号转导。IL-10 R β 分别与IL-20 R α 、IL-22 R α 1和IL-28 R α 形成IL-22、IL-26、IL-28和IL-29的受体复合物。

IL-10参与抑制和激活作用的免疫调节。IL-10作为抗炎症的细胞因子是通过抑制Th1细胞和Th17细胞的激活和扩张，同时促进M2巨噬细胞的形成。免疫抑制调节T细胞和B细胞的表达对Treg细胞增殖有重要作用。在肿瘤微环境中，IL-10抑制调节T细胞和髓系来源抑制细胞的增殖。IL-10诱导瘤内物质的累积并激活CD8⁺T细胞。IL-10在限制关节炎中的组织损伤，促进损伤后肌肉再生过程中发挥重要保护作用，但也促成持久性病毒感染。在修格兰氏症候群（唾液）和原发性中枢神经系统淋巴瘤中IL-10的含量有所升高。

产品说明书

性能

注意事项

1. 请在试剂盒有效期内使用。
2. 不同试剂盒及不同批号试剂盒的组分不能混用。
3. 样本值若大于标准曲线的最高值，应将样本用稀释剂（1×）稀释后重新检测；若细胞培养上清液样本需分布稀释，除最后一步用稀释剂稀释外，其它中间稀释可采用细胞培养基。
4. 检测结果的不同可由多种因素引起，包括实验人员的操作、移液器的使用方式、洗板技术、反应时间或温度、试剂盒的储存等。
5. 试剂盒中的终止液是酸性溶液，使用时请做好眼镜、手、面部及衣服的防护。
6. 仅供科研使用，不可用于体外诊断。

本产品仅作科研实验使用，不支持临床等研究