

货号: abs530006

规格: 96T

品名: Rat IL-4 ELISA KIT

一、背景

白细胞介素4 (IL-4), 又称为B 细胞刺激因子1, 是一个约为18-20kDa 的单体细胞因子, 在免疫反应中呈多向性效应。小鼠IL-4 的前体有140 个氨基酸, 包括一个20 个氨基酸的信号肽和一个120 氨基酸的成熟链。IL-4 含有3 个N 链接糖基化潜在位点, 3 个链内二硫键, 其结构为一个捆绑的四 α -螺旋体。与人IL-4 相似, 小鼠IL-4 有一个小的选择性剪切体。与人IL-4 不同的是, 此剪切体被认为表达很低, 意义不大。成熟的小鼠IL-4 氨基酸序列与人和大鼠IL-4 分别有43%和63%同源性。研究显示, 人、小鼠和大鼠IL-4 的活性均属于种属特异性。IL-4 由趋向Th2的CD4+ T 细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞、NKT 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞和嗜酸性细胞表达。

IL-4 在 2 型免疫反应中起关键作用, 能促进Th2 分化和 B 细胞分泌免疫球蛋白 G1 和免疫球蛋白 E 亚型。IL-4 通过结合 I 型或 II 型受体复合物引起 Th2 分化, 该复合物含有分别与 γ 链或IL13R α 1 偶联 IL-4 受体 α 亚基。通过细胞表面 IL-4 受体的异二聚体化, 激活 JAK 族蛋白酪氨酸激酶, 引起其细胞质内 C 端磷酸化。从而引发 STAT6 的招募和磷酸化。随着 STAT6 的磷酸化、构象发生变化, 导致 STAT6 的二聚体化、核转位、与靶基因DNA 结合和转录激活, 这些靶基因包括IL-4、IL-5、IL-13 以及 Th2 特异性因子 GATA3 和 c-Maf 等。在功能上, IL-4 促进小鼠 B 细胞增殖、生存和免疫球蛋白类转换为 IgG1 和 IgE, 促进肥大细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞的启动和趋化, 促进幼稚 CD4+ 细胞获得 Th2 表型, 以及促进上皮细胞的增殖和活化。在肿瘤免疫学方面, IL-4 也是一个重要细胞因子。在早期小鼠实验中, 研究人员发现 IL-4 具有强大的抗肿瘤能力。小鼠排斥表达 IL-4 的肿瘤, 形成长期的抗肿瘤免疫。这可能是由于 IL-4 具有抗血管生成作用或激活、选择 CD8+ T 细胞的能力。不可理喻的是, 新的证据显示IL-4 是一个促肿瘤分子, 因此 IL-4 是一个具有反向作用的细胞因子。可能的解释是, IL-4 诱导肿瘤细胞中的抵抗凋亡分子上调, 和CD8+T 细胞中的溶细胞分子下调。另外, 肿瘤产生的 IL-4 也被认为可作用于局部肿瘤相关巨噬细胞 (TAMs), 从而诱导促进细胞迁移的组织蛋白酶的分泌。

二、概述

1. 检测原理

本试剂盒采用双抗体夹心酶联免疫吸附检测技术。特异性抗大鼠 IL-4 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-4 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 450 nm 波长(参考校正波长 540nm 或 570nm) 测定吸光度值。

2. 检测局限

- 仅供科研使用, 不可用于体外诊断;
- 请在试剂盒有效期内使用;

- 不同试剂盒及不同批号试剂盒的组分不能混用；
- 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；
- 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。

三、试剂盒组成及所需器材

1. 试剂盒组成及储存

未开封试剂盒，2-8℃储存；请在试剂盒有效期内使用

组成	描述	规格	拆封后，稀释或重溶的试剂有效期
Rat IL-4 Microplate	已包被抗体的96孔聚苯乙烯	1块	将未使用的板条放回带有干燥剂的铝箔袋中密封后，置于2-8℃储存，30天
Rat IL-4 标准品	Rat IL-4标准品（冻干）	2支	溶解后，计算用量分装，可在-20℃储存14天
Rat IL-4检测抗体	Rat IL-4检测抗体（冻干）	1支	浓缩体积溶解后，可在2-8℃储存14天
40×SA-HRP	链霉亲和素-HRP（40×）	1支	40倍浓度于2-8℃保存；1倍工作浓度不建议保存
10×浓缩稀释用缓冲液	浓缩稀释用缓冲液（10×），6ml	1瓶	开封后，2-8℃储存，30天
显色液	TMB底物	1瓶	
终止液	6ml 强酸，用于破坏HRP酶结构	1瓶	
25×浓缩洗涤缓冲液	浓缩洗液，20ml/瓶	1瓶	
封板膜	96孔板封板膜	3张	常温存放，为避免污染，不可重复使用

2. 实验所需自备试验器材

- 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）
- 高精度加液器及一次性吸头
- 蒸馏水或去离子水
- 洗瓶（喷瓶）、多通道洗板器或自动洗板机
- 500mL 量筒

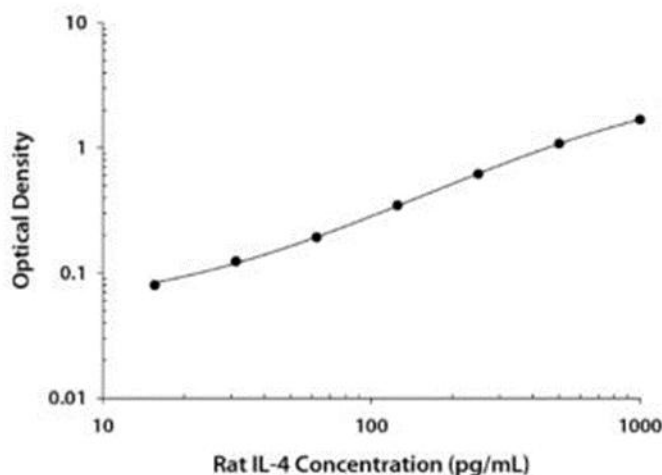
3. 注意事项

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。

四、实验

1. 实验标准

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。



2. 实验前准备

1) 样品收集及储存

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。样本可能需要用稀释剂（1×）稀释。

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 1000 g。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。样本可能需要用稀释剂（1×）稀释。

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 1000 g，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。样本可能需要用稀释剂（1×）稀释。

2) 检测前准备工作

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

1×洗涤液配制：试剂盒中的浓缩洗涤液为25×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+240ml蒸馏水定容至250mL，实际操作时可先计算使用量，再进行配制。

1×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。

检测抗体：将干粉离心至管底，使用110μL稀释用缓冲液（1×）溶解，室温静置5min后得到100×母液；使用前需稀释为1×工作液。按照每孔用量100μL计算所需体积。**例：**使用了10个孔，则取10μL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

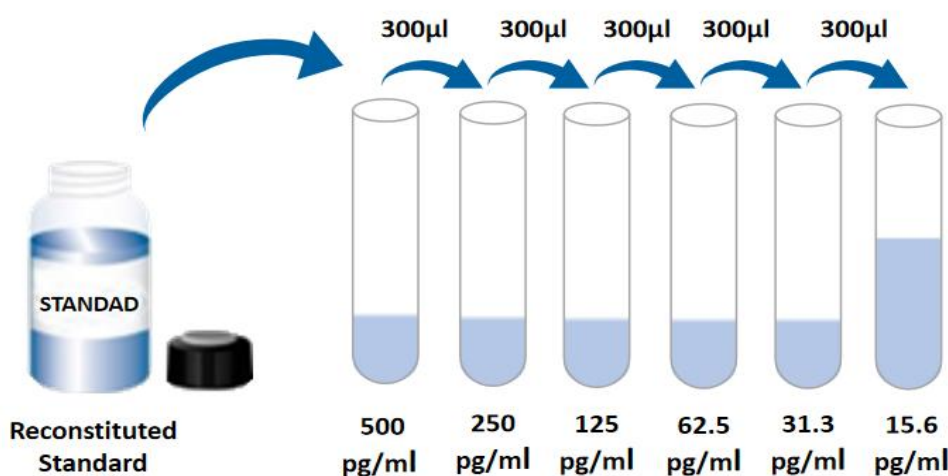
到1ml的1×工作浓度的检测抗体。

SA-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100 μL。例：使用了10个孔，则取25μL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。

显色液: 按每孔100 μL，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。

标准品: 冻干标准品用稀释用缓冲液（1×）重溶，重溶体积1000μL，得到浓度为1000pg/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 300 μL 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（1000pg/mL），稀释用缓冲液（1×）可用作标准曲线零点（0 pg/mL）。



3. 实验操作步骤

- 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300μL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；
- 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 100 μL。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 300μL，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 100 μL 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 100 μL SA-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 100 μL 显色液，室温孵育 5-30 分钟，注意避光；
- 11) 在每个微孔内加入 50 μL 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/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。

五、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大鼠 IL-4，测定其回收率。回收率范围在 75-112%，平均回收率在 90%。

2. 灵敏度

大鼠 IL-4 的最低可测剂量（MDD）一般小于 2.3 pg/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浓度。

3. 校正

此 ELISA 试剂盒经大肠杆菌表达的高纯度重组大鼠 IL-4 蛋白所校正。

4. 线性

4 个不同的样本中掺入高浓度的大鼠 IL-4，然后用稀释剂（1×）将样本稀释到检测范围内，测定其线性。

稀释倍数	平均值/期待值 (%)	范围 (%)
1:2	102	96 - 105
1:4	103	98 - 108
1:8	109	103 - 116
1:16	102	98 - 105

5. 特异性

此 ELISA 法可检测天然及重组大鼠 IL-4 蛋白。

六、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	购买新的试剂盒，注意储存条件；不可混用
2	孵育温度低，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	严格按说明书操作
6	试剂温度不均一	所有试剂要室温平衡 30 min
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	配置时使用干净容器以及合格蒸馏水；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，避免孔内进入纸屑尘
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

七、总体步骤图

