

Human IL-12 p70 ELISA Kit

使用前请仔细阅读说明书

目录号：NE103

保存：2~8℃避光保存1年





品质高于一切
精品服务客户



目录

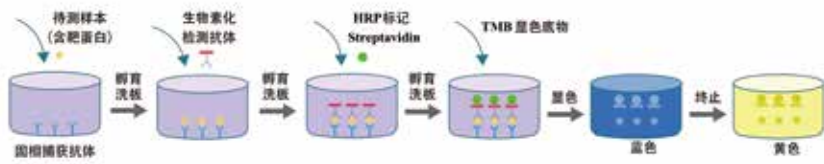
1.	产品说明.....	1
2.	产品适用性.....	2
3.	试剂盒组成.....	2
4.	自备材料设备.....	2
5.	样本收集.....	2
6.	样本稀释.....	3
7.	工作液配制.....	3
8.	操作步骤.....	4
9.	酶标板孔加样示意图.....	5
10.	结果分析.....	5
11.	参考数据.....	6
12.	精密度.....	6
13.	回收率.....	6
14.	线性.....	7
15.	校准.....	7
16.	灵敏度.....	7
17.	样本值.....	7
18.	特异性.....	7
19.	注意事项.....	8



产品说明

白细胞介素-12 (Interleukin- 12, IL-12), 又称为IL-12 p70, 是一个由IL-12A (p35) 和IL-12B (p40) 两个亚基组成的异源二聚体, 分子量为70-75 kD。IL-12 p70是一种分泌型蛋白, 主要由巨噬细胞、树突状细胞、单核细胞、中性粒细胞或其他抗原呈递细胞在响应抗原刺激时产生并分泌, 在免疫细胞的成熟、活化、增殖和免疫调节中均发挥重要作用。IL-12 p70作为一种T细胞刺激因子, 能够有效促进T细胞的增殖和功能, 并参与naïve T细胞向Th1细胞分化的过程。IL-12 p70是细胞毒性淋巴细胞成熟因子, 在肿瘤微环境中, IL-12 p70刺激活化的T细胞和自然杀伤细胞释放毒杀性的酶类或分泌效应细胞因子如IFN- γ , 这些效应分子对于肿瘤的清除至关重要。

本试剂盒采用双抗体夹心ELISA法定量测定人血清和血浆中的IL-12 p70含量。本试剂盒采用高亲和力的抗人IL-12 p70抗体预包被酶标板, 将标准品/待测样本加入微板孔中, 经过孵育后样本中存在的IL-12 p70会与酶标板上的预包被抗体特异性结合。洗涤去除未结合物后, 将生物素标记的抗人IL-12 p70检测抗体加入微板孔中, 再次孵育后检测抗体会与锚定在酶标板上的IL-12 p70特异性结合。随后, 将辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(Streptavidin-HRP)加至微孔板中并孵育, 通过检测抗体上的生物素和链霉亲和素发生的高强度非共价结合, 形成“包被抗体-人IL-12 p70蛋白-检测抗体-Streptavidin-HRP”免疫复合物。再次洗涤后, 将显色底物TMB加至微板孔中, HRP会催化TMB底物生成蓝色产物, 颜色反应的深浅将与样本中IL-12 p70的浓度成正相关。而后加入终止液终止反应, 在450 nm波长(参考波长570 - 630 nm)处测定吸光度值。通过绘制标准曲线, 由样本吸光度值可计算出样本中所含IL-12 p70浓度。本试剂盒特异性强、检测灵敏度高, 同时操作更加便捷。



双抗体夹心ELISA原理示意图



产品适用性

血清、血浆等。

试剂盒组成

Component	NE103-01	Storage
人IL-12 p70抗体预包被酶标板	96 T	2~8°C
人IL-12 p70标准品	2瓶	2~8°C
标准品&样本稀释液	15 ml/瓶	2~8°C
100×人IL-12 p70检测抗体	120 μl/支	2~8°C
100×Streptavidin-HRP	120 μl/支	2~8°C (避光)
检测抗体&Streptavidin-HRP稀释液	25 ml/瓶	2~8°C
20×洗液	50 ml/瓶	2~8°C
TMB显色底物	12 ml/瓶	2~8°C (避光)
终止液	6 ml/瓶	2~8°C
封板膜	4张	

注意：试剂盒在开封的条件下，2~8°C可储存1个月；未开封试剂盒请在有效期1年内使用。

自备材料设备

1. 酶标仪：主波长450 nm，参考波长620 nm；
2. 去离子水；
3. 实验过程中用到的EP管、移液器、吸头、量筒等；
4. 微孔板震荡器；
5. 自动洗板机或8道手动洗瓶或多道移液器。

样本收集

1. 血清样本：血液室温自然凝固30分钟后，1000×g，4°C离心10分钟，然后将上清等量分装于EP管中并保存于-20°C，避免反复冻融（24小时内检测可于2~8°C保存）。
2. 血浆样本：抗凝剂推荐使用EDTA或柠檬酸钠、肝素。将全血收集到含抗凝剂的采血管中，混匀后室温放置至少20分钟，1000×g，4°C离心10分钟，然后将上



清等量分装于EP管中并保存于-20°C，避免反复冻融（24小时内检测可于2~8°C保存）。

注意：溶血、高血脂的血清、血浆样本可能会影响检测结果的准确度，应尽量避免使用。

样本稀释

1. 血清/血浆样本需要用标准品&样本稀释液2倍稀释后进行检测，例如：

100 μl血清+100 μl 标准品 &样本稀释液。

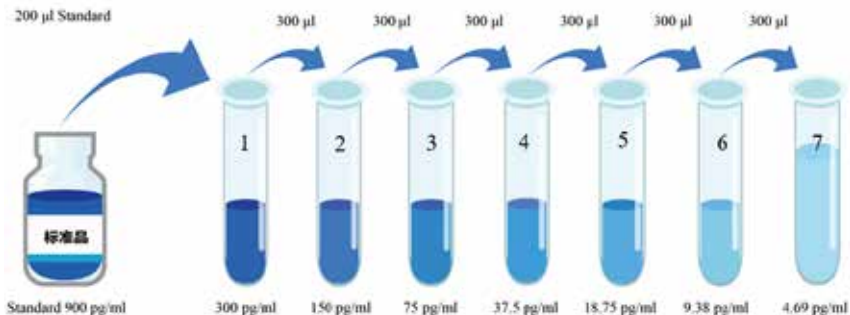
2. 建议正式实验前做预实验以确定稀释倍数。

工作液配制

配制前请将所有试剂恢复至室温。20×洗液若出现结晶，放37°C温浴至结晶全部溶解。

- 1) **1×人 IL-12 p70 检测抗体**：使用前点甩离心，使管壁上的液体集中在管底。按当次实验所需用量，用检测抗体&Streptavidin-HRP稀释液将100×人IL-12 p70检测抗体稀释至1×工作浓度。配制完成后需在15分钟内使用。
- 2) **1×Streptavidin-HRP**：使用前点甩离心，使管壁上的液体集中在管底。按当次实验所需用量，用检测抗体&Streptavidin-HRP稀释液将100×Streptavidin-HRP稀释至1×工作浓度。配制完成后需在15分钟内使用。
- 3) **1×洗液**：按当次实验所需用量，用去离子水将20×洗液稀释至1×工作浓度。配制完成后可在2~8°C保存30天。
- 4) **人 IL-12 p70 标准品溶解**：根据标准品标签上标注的溶解体积，用相应体积的标准品&样本稀释液对冻干标准品进行溶解，复溶后标准品的浓度为900 pg/ml，复溶后的标准品请在30分钟内使用。
- 5) **标准品梯度稀释**：用标准品&样本稀释液将复溶后的标准品稀释3倍，即取复溶后的标准品200 μl，加入到400 μl标准品&样本稀释液中，充分混匀，记为1号管，此时1号管的浓度为300 pg/ml；然后按照下图进行2倍梯度稀释，在2-7号管中分别加入300 μl标准品&样本稀释液；取300 μl 1号管液体加入至2号管，此时2号管的浓度为150 pg/ml，混匀后取300 μl加入至3号管，此时3号管的浓度为75 pg/ml，以此类推梯度稀释至7号管（4.69 pg/ml）。300 pg/ml作为标准曲线的最高点，标准品&样本稀释液作为标准曲线的零点（0 pg/ml），即空白值。



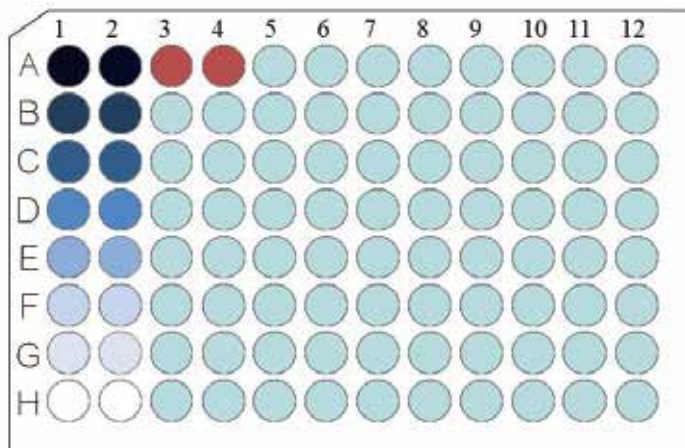


操作步骤

1. 检测前请将所有试剂恢复至室温。取出当次实验所需板条，未用的板条请及时放入铝箔袋中封口，2~8℃保存。
2. 将稀释好的标准品及样本分别加入到对应的板孔中，100 µl/孔，在微孔板振荡器上震荡30秒混匀，盖好封板膜后室温孵育2小时；标准品和样本建议做复孔检测，且加入试剂的顺序应保持一致，使各复孔测试结果一致。
3. 弃掉孔内液体，用1×洗液洗板，300 µl/孔，每次洗板时建议先在微孔板振荡器上震荡30秒后，弃掉孔内洗液。重复操作5次，末次在吸水纸上拍干。
4. 在所有板孔中加入1×检测抗体，100 µl/孔，在微孔板振荡器上震荡30秒混匀，盖好封板膜后室温孵育1小时。
5. 重复步骤3。
6. 在所有板孔中加入1×Streptavidin-HRP，100 µl/孔，在微孔板振荡器上震荡30秒混匀，盖好封板膜后室温孵育30分钟。
7. 重复步骤3。
8. 在所有板孔中加入TMB显色底物，100 µl/孔，在微孔板振荡器上震荡30秒混匀，盖好封板膜后室温孵育20分钟。
9. 孵育完成后加入终止液，50 µl/孔，在主波长450 nm，参考波长620 nm的波长下进行读数。
10. 实验完毕后将未用完的试剂及酶标板外框放回试剂盒并于2~8℃储存，建议1个月内用完。



酶标板孔加样示意图



注：A1/A2：100 μ l 300 pg/ml标准品

B1/B2：100 μ l 150 pg/ml标准品

C1/C2：100 μ l 75 pg/ml标准品

D1/D2：100 μ l 37.5 pg/ml标准品

E1/E2：100 μ l 18.75 pg/ml标准品

F1/F2：100 μ l 9.38 pg/ml标准品

G1/G2：100 μ l 4.69 pg/ml标准品

H1/H2：100 μ l 0 pg/ml标准品（即标准品&样本稀释液）

A3/A4：100 μ l 样本

结果分析

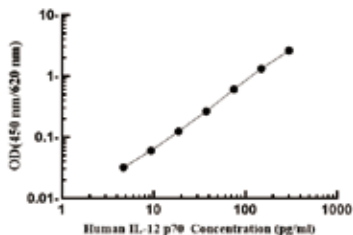
1. 用酶标仪进行双波长检测，测定主波长450 nm和参考波长620 nm的OD值。OD值为450 nm的OD测定值减去620 nm的OD测定值。
2. 计算标准品复孔的平均OD值，然后减去空白值（0 pg/ml标准品的平均OD值），得到标准品的校正值。以标准品的浓度为横坐标，OD校正值为纵坐标，用直线回归或四参数法生成标准曲线。
3. 通过样本OD值和标准曲线方程计算样本浓度。若样本OD值高于标准曲线上限，应进行适当稀释后重测，计算浓度时应乘以相应稀释倍数。



参考数据

每次检测均需建立标准曲线，以下数据仅作为建立标准曲线的参考数据。

标准品 pg/ml	OD值		平均值	校正值
300	2.611	2.701	2.656	2.627
150	1.356	1.363	1.3595	1.3305
75	0.643	0.634	0.6385	0.6095
37.5	0.302	0.29	0.296	0.267
18.75	0.153	0.153	0.153	0.124
9.38	0.079	0.099	0.089	0.06
4.69	0.061	0.061	0.061	0.032
0	0.029	0.029	0.029	0



标准品复孔结果数据解读：上表中0 pg/ml标准品两个复孔的平均OD值为 $(0.029+0.029)/2=0.029$ ，校正值定为0。300 pg/ml标准品两个复孔的平均OD值为 $(2.611+2.701)/2=2.656$ ，则其校正值为 $2.656-0.029=2.627$ 。

精密度

板内精密度

用3个已知浓度的样本在一块酶标板上测定20个重复孔，以此评估板内的精密度。

板间精密度

用3个已知浓度的样本在不同酶标板上测定20个重复孔，以此评估板间的精密度。

	板内			板间		
	1	2	3	1	2	3
平均值(pg/ml)	23.8	52.6	106.7	20.9	48.9	99.3
标准差	1.8	2.7	4.3	1.9	3.2	6.8
变异系数 (%)	7.6	5.1	4.0	9.1	6.5	6.8

回收率

在4份健康人的血清、血浆中加入不同浓度的人 IL-12 p70，未加IL-12 p70 的样本作为本底，计算回收率。



样本类型	平均回收率 (%)	范围 (%)
血清	105	83~119
EDTA血浆	107	89~120
柠檬酸钠血浆	107	83~120
肝素血浆	89	86~101

线性

在4份健康人的血清、血浆中加入高浓度的人 IL-12 p70，进行线性稀释，以此检测线性回收率。

稀释比例	回收率 (%)	血清	EDTA血浆	柠檬酸钠血浆	肝素血浆
1:2	平均值 (%)	106	84	94	91
	范围 (%)	103~108	81~89	86~98	89~92
1:4	平均值 (%)	108	82	112	93
	范围 (%)	106~109	80~86	104~120	91~95
1:8	平均值 (%)	108	91	118	107
	范围 (%)	106~109	86~96	110~116	101~116

校准

本试剂盒的标准品为TransGen Biotech校准过的高纯度的重组人 IL-12 p70。

灵敏度

人 IL-12 p70 的最低可检测浓度为2 pg/ml。灵敏度是根据20个重复的零标准品OD值的平均值加两倍标准差计算得到的相对应浓度。

样本值

使用本试剂盒检测了30份健康人血清样本中IL-12 p70的水平，30份样本的检测值均低于4.69 pg/ml。

特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人IL-12 p70。利用重组人的TNF- α 、GM-CSF、IL-2、IL-23、IL-12B、IL-6、IL-10、FGF basic、IFN- γ 等细胞因子进行特异性的评估，没有观察到交叉反应和干扰影响。



注意事项

1. 本试剂盒应2~8℃避光保存，开封后1个月内用完。
2. 为保证结果准确，每次检测均需做标准曲线。
3. 实验中所用试剂均需充分混匀。
4. 每次洗板完成后，均需在吸水纸上拍干，若板孔内有气泡，可用吸头戳破，注意每个孔只能用一个吸头，避免交叉污染。
5. TMB显色底物为无色透明液体，如有变色请勿使用。
6. TMB显色后可根据显色的深浅来判断是否需要提前或延后加入终止液。
7. 加完终止液后，请在30分钟内完成读数。
8. 推荐使用主波长450 nm，参考波长620 nm的波长下进行读数，若只使用单波长450 nm读数，OD值可能整体偏高，空白值也会相应增高，导致试剂盒的准确度降低。
9. 试剂盒中的终止液具有腐蚀性，操作人员在使用时需戴上手套并注意防护，如果不慎接触，请用大量清水冲洗并及时就医。
10. 为避免交叉污染，加样时请注意每个样品和标准品必须更换枪头。请在实验中使用一次性试管、枪头、封板膜及洁净塑料容器。
11. 不同批号或不同来源的试剂盒组分不可混用。



本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V1.0-202206

服务投诉电话 +86-10-57815020

服务投诉邮箱 complaints@transgen.com.cn

