

IL-4 : IL-4R α 抑制剂筛选试剂盒

(酶联免疫分析法)

【产品名称】

IL-4 : IL-4R α 抑制剂筛选试剂盒(ELISA)

【规格】

96 Tests

【货号】

EP-132

【检测原理】

本试剂盒应用ELISA竞争法。将Human IL-4 R alpha包被于微孔板上，样本中的IL-4抑制剂与微孔板上固定的Human IL-4 R alpha特异性竞争Human IL-4-Biotin，最后加入Streptavidin-HRP，用底物显色，随后用终止液终止，板孔中溶液会由蓝色变为黄色。使用酶标仪在450 nm和630 nm处测定样品吸光度值（OD_{450 nm}、OD_{630 nm}），OD值与样本中的IL-4抑制剂含量呈负相关。

【产品组份】

表1.产品组份

| ID | 组份名称 | 规格 (96 T) | 物理状态 | 存储条件 | |
|-----------|--------------------|------------|------|-----------|-----------|
| | | | | 未开启 | 已开启 |
| EP132-C01 | High-bind Plate | 1 plate | 固体 | 2-8°C | 2-8°C |
| EP132-C02 | Human IL-4 R alpha | 30 μ g | 固体 | 2-8°C | -70°C |
| EP132-C03 | Human IL-4 | 20 μ g | 固体 | 2-8°C | -70°C |
| EP132-C04 | Human IL-4-Biotin | 10 μ g | 固体 | 2-8°C | -70°C |
| EP132-C05 | Streptavidin-HRP | 10 μ g | 固体 | 2-8°C, 避光 | -70°C, 避光 |

| | | | | | |
|-----------|--------------------|-------|----|-----------|-----------|
| EP132-C06 | Coating Buffer | 12 mL | 液体 | 2-8°C | 2-8°C |
| EP132-C07 | 10xWashing Buffer | 50 mL | 液体 | 2-8°C | 2-8°C |
| EP132-C08 | Blocking Buffer | 50 mL | 液体 | 2-8°C | 2-8°C |
| EP132-C09 | Substrate Solution | 12 mL | 液体 | 2-8°C, 避光 | 2-8°C, 避光 |
| EP132-C10 | Stop Solution | 7 mL | 液体 | 2-8°C | 2-8°C |

【运输和储存条件】

1. 未开封：试剂盒保存于2-8°C，试剂盒自生产之日起有效期为12个月，有效期见外包装盒标签。
2. 已开封：试剂盒开封后各组分按照表1存储条件保存，有效期自开封之日起为30天，未使用完的微孔板条需与干燥剂一起密封保存。

注：不要使用过期试剂。

【需要但未提供的实验仪器与耗材】

1. 单道、多道微量移液器和移液器吸头：需满足10 μL、300 μL、1000 μL加样需求
2. 恒温培养箱
3. 酶标仪，含450 nm/630 nm波长
4. 离心管：1.5 mL，10 mL
5. 计时器
6. 试剂瓶
7. 超纯水或去离子水

【试剂准备】

使用前将所有试剂恢复至室温 (20°C-25°C)。如果溶液中有晶体形成，需平衡溶液至晶体完全溶解（可将溶液放置于恒温培养箱37°C平衡10-15 min）。

按照表2建议，用超纯水将所提供的冻干品配制成存储溶液，在室温下溶解15至30分钟，轻轻吹吸混匀，避免剧烈摇动或涡旋。重构的存储液应在-70°C保存，建议冻融次数不要超过3次，冻融规格不低于5ug。

注：Streptavidin-HRP存储液应避光保存。

表2. 配制方法

| ID | 组份名称 | 规格 (96 T) | 存储液浓度. | 重构水体积Vol. |
|-----------|--------------------|-----------|-----------|---------------|
| EP132-C02 | Human IL-4 R alpha | 30 µg | 200 µg/mL | 150 µL, water |
| EP132-C03 | Human IL-4 | 20 µg | 100 µg/mL | 200 µL, water |
| EP132-C04 | Human IL-4-Biotin | 10 µg | 100 µg/mL | 100 µL, water |
| EP132-C05 | Streptavidin-HRP | 10 µg | 100 µg/mL | 100 µL, water |

【检测流程】

1. 工作液配制

1.1 配制1xWashing Buffer:

取50 mL 10xWashing Buffer，用超纯水/去离子水稀释并定容至500 mL，轻轻混匀。

1.2 配制Dilution Buffer:

将Blocking Buffer(EP132-C08) 用1xWashing Buffer进行4倍稀释。例：10 mL Blocking Buffer加入30 mL 1xWashing Buffer。

1.3 配制Human IL-4-Biotin工作液:

用Dilution Buffer将Human IL-4-Biotin存储液(100 µg/mL)稀释至0.02 µg/mL。

注：Human IL-4-Biotin工作液应在实验前准备，不可保存。

2. 包被微孔板

2.1 用 Coating Buffer(EP132-C06)将 Human IL-4 R alpha 存储液(200 µg/mL)稀释至 2 µg/mL，配制成 Human IL-4 R alpha 包被工作液。

2.2 请保留数个不加包被工作液的空白孔(只需加 Coating Buffer)作 No-Coating Ctrl. (表 3)。

2.3 在 High-bind Plate(EP132-C01)每个板孔中加入 100 µL Human IL-4 R alpha 包被工作液，用封板膜封板，在 4°C 条件下孵育过夜 (或孵育 16 小时)。

3. 洗板

小心揭开封板膜，弃去孔中液体，每孔加入 300 µL 1xWashing Buffer，浸泡 10 s，共洗板 3 次。每次洗板后，需在吸水纸上拍干，也可选择机洗。

4. 封闭

在每个孔中加入 300 μ L Blocking Buffer(EP132-C08), 用封板膜封板, 在 37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 1.5 小时。

5. 洗板

重复步骤 3 洗板。

6. 加样

6.1 根据实验需要对样本进行系列稀释。

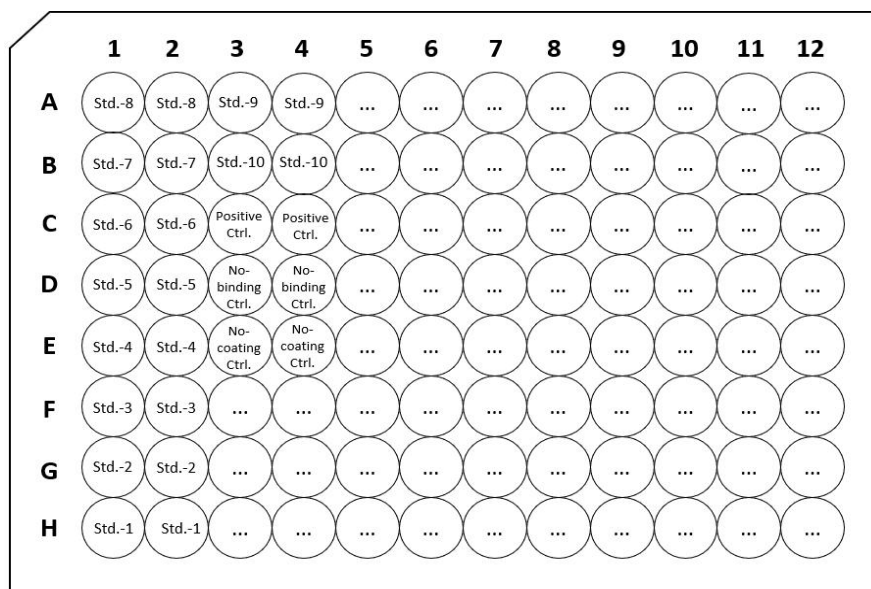
6.2 若使用试剂盒内的 Human IL-4(EP132-C03)作为参考品, 请按照图 1 进行稀释处理。

图 1 Human IL-4 参考品工作液的制备

| Tubes/ Solution Code | Human IL-4 stock solution | Std.-1 | Std.-2 | Std.-3 | Std.-4 | Std.-5 | Std.-6 | Std.-7 | Std.-8 | Std.-9 | Std.-10 |
|----------------------------|------------------------------|--------------|----------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Operating | 15 μ L | 150 μ L | 150 μ L | 150 μ L | 150 μ L | 150 μ L | 150 μ L | 150 μ L | 150 μ L | 150 μ L | 150 μ L |
| Solution Con. | 100 μ g/mL | 5 μ g/mL | 2.5 μ g/mL | 1.25 μ g/mL | 0.625 μ g/mL | 0.313 μ g/mL | 0.156 μ g/mL | 0.078 μ g/mL | 0.039 μ g/mL | 0.020 μ g/mL | 0.010 μ g/mL |
| Dilution Buffer Vol. | | 285 μ L | 150 μ L | 150 μ L | 150 μ L | 150 μ L | 150 μ L | 150 μ L | 150 μ L | 150 μ L | 150 μ L |

6.3 根据实验需要或参考图 2 进行微孔板加样设计, 在对应板孔内加入 50 μ L 梯度稀释后的标准品和待测样本。No-Coating Ctrl.和 No.Binding Ctrl.孔加入 50 μ L Dilution Buffer。

图 2. 微孔板设计参考



6.4 除 No.Binding Ctrl.孔外，每孔加入 50 μ L Human IL-4-Biotin 工作液。轻轻震荡微孔板使溶液混匀，用封板膜封板，在 37°C 下孵育 1.0 h。

7. 洗板

重复步骤 3 洗板。

8. 加 Streptavidin-HRP 工作液

8.1 用 Dilution Buffer 将 Streptavidin-HRP 存储液(100 μ g/mL)稀释至 0.1 μ g/mL，配制为 Streptavidin-HRP 工作液，该工作液现用现配，避光保存。

8.2 在所有孔内加入 100 μ L Streptavidin-HRP 工作液，用封板膜封板，在 37°C 下孵育 1.0 h。

9. 洗板

重复步骤 3 洗板。

10. 显色

将微孔板拍干，每孔加入 100 μ L Substrate Solution。用封板膜封板，放置 37°C 恒温培养箱避光孵育 20 min。

11. 终止

每孔加入 50 μ L Stop Solution，轻轻震荡酶标板至混合均匀。

注：孔中液体由蓝色变为黄色。

12. 读数

用酶标仪测定各孔在 450 nm 和 630 nm 波长的吸光值，请在终止后 3 分钟内读数。

注：各孔 $OD_{450\text{ nm}}$ 扣除 $OD_{630\text{ nm}}$ 读值可降低背景干扰。

表3 实验操作规程

| Step Code | Steps | Reagents & Instruments | Reaction Conditions | Samples | No-binding Ctrl. | No-coating Ctrl. | Positive Ctrl. |
|-----------|---------------------------|--|--|-------------|------------------|------------------|----------------|
| 1 | Working fluid preparation | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A |
| 2 | Coating | Human IL-4 R alpha Working Solution | 4°C for overnight | 100 μ L | 100 μ L | — | 100 μ L |
| 3 | Washing | 1xWashing Buffer | Wash for 3 times | 300 μ L | 300 μ L | 300 μ L | 300 μ L |
| 4 | Blocking | Blocking Buffer | 37°C for 1.5 hours | 300 μ L | 300 μ L | 300 μ L | 300 μ L |
| 5 | Washing | 1xWashing Buffer | Wash for 3 times | 300 μ L | 300 μ L | 300 μ L | 300 μ L |
| 6 | Add Samples | Samples | Incubate at 37°C for 1 hour | 50 μ L | — | — | — |
| | | Dilution Buffer | | — | 50 μ L | 50 μ L | 50 μ L |
| 7 | Binding | Biotinylated Human IL-4 Working Solution | | 50 μ L | — | 50 μ L | 50 μ L |
| | | Dilution Buffer | | — | 50 μ L | — | — |
| 8 | Washing | 1xWashing Buffer | Wash for 3 times | 300 μ L | 300 μ L | 300 μ L | 300 μ L |
| 9 | Streptavidin-HRP | Streptavidin-HRP Working Solution | 37°C for 1 hours | 100 μ L | 100 μ L | 100 μ L | 100 μ L |
| 10 | Washing | 1xWashing Buffer | Wash for 3 times | 300 μ L | 300 μ L | 300 μ L | 300 μ L |
| 11 | Substrate Reaction | Substrate Solution | 37°C for 20 minutes | 100 μ L | 100 μ L | 100 μ L | 100 μ L |
| 12 | Termination | Stop Solution | Mix by gentle tapping | 50 μ L | 50 μ L | 50 μ L | 50 μ L |
| 13 | Data Recording | UV/Vis spectrophotometer | Measure absorbance at 450 nm, with the correction wavelength set at 630 nm | | | | |

注：

1. Samples: 您感兴趣的样本。
2. No-binding Ctrl.: 不加Human IL-4-Biotin反应的微孔。OD_{450 nm}在0.05左右（或小于0.1）。

3. No-coating Ctrl.: 包被时未加Human IL-4 R alpha的微孔. OD_{450 nm}在0.05左右 (或小于0.1)。
4. Positive Ctrl.: 样本中不含抑制剂时OD_{450 nm}的最大值。
5. 建议所有样本、对照品及参考品复孔点样。

【注意事项】

1. 本产品仅供科研使用，不能用于治疗 and 诊断。
2. 请严格按使用说明进行操作。
3. 不同批号的试剂不能混用。不可与其他厂家试剂混用。
4. 使用前各组份需平衡至室温，保证溶液晶体全部溶解。请在无尘洁净的环境下进行操作使用。
5. 试剂盒请在 2-8°C保存，请勿使用过有效期的试剂盒。
6. 请根据实验需要配制各组份工作液，除 1xWashing Buffer 以外，工作液即配即用，不可保存。

【典型数据】

每次实验，每块酶标板都需要设置标准曲线，以下标准曲线数据仅供参考。

