



Rat IL-1 α ELISA KIT

Catalog No.	EM63008-01	EM63008-02
Size	48T	96T

实验原理:

本试剂盒用于体外定量检测大鼠血清、血浆或细胞培养上清液中天然和重组 IL-1 α 浓度, 供科研使用。**使用前请仔细阅读说明书并检查试剂组分。**

白介素-1 α (IL-1 α , 又名 IL-1F1) 和 IL-1 β (IL-1F2) 是细胞外分泌型信号多肽, 属于 IL-1 基因家族。IL-1 α 和 IL-1 β 结合到共同的细胞表面受体, 行使相同的生物学功能。这两个蛋白约有 23% 的氨基酸同源性, 均为 31kDa 大小的前体蛋白, 不含疏水信号肽。目前有证据显示 IL-1 不是通过典型途径分泌的 (1-4)。

大鼠 IL-1 α cDNA 编码 270 个氨基酸的 IL-1 α 前体 (5)。pro 区长短为 114 个氨基酸, 含有一个核定位序列, 一个赖氨酸酰基化位点, 一个磷酸化位点和一个潜在的 N-糖基化位点 (5-8)。成熟区为 156 个氨基酸, 不含有半胱氨酸和 N 糖基化位点 (5)。前体 IL-1 α 在合成后定位于胞浆, 细胞活化后转移到细胞核并开始转录 (9, 10)。也有一些 IL-1 α 以膜结合的方式或者 17kDa 大小的循环分子被释放到胞外, 通过还不为熟知的细胞表面血凝素和糖基化 IL-1 α 前体形式相互作用或者烷基化 IL-1 α 前体和质膜磷脂之间的作用来结合到膜上 (8, 11-13)。Calpain 激活 IL-1 α 前体, 以 17kDa 的可溶形式释放出来 (14)。不像 IL-1 β 前体那样没有生物学活性, 前体 IL-1 α 和成熟 IL-1 α 都有生物学活性 (15,16)。成熟后的蛋白中, 大鼠 IL-1 α 和小鼠, 兔子, 人, 牛, canine and feline 分别有 79%, 60%, 59%, 58%, 57%, 和 56% 的氨基酸同源性 (17-21)。可表达 IL-1 α 的哺乳动物细胞有褐色脂肪细胞 (22), 角蛋白细胞 (23), 单核细胞 (24), 巨噬细胞 (25), 内皮细胞和平滑肌细胞 (26), 肥大细胞 (27), 雪旺细胞 (28), 成骨细胞和破骨细胞 (29)。

三个 I 型转膜免疫球蛋白超家族成员蛋白, IL-1 I 型受体(IL-1 R1), IL-1 II 型受体(IL-1 R2) 和 IL-1 受体必须蛋白(IL-1 RAcP, IL-1 R3) 均参与高亲和细胞表面 IL-1 受体复合物的形成。IL-1R1 和 IL-1 R2 可直接和 IL-1 α 结合。IL-1 RAcP 不直接和 IL-1 α 结合, 但是在 IL-1 的存在下和 IL-1 R1 作用形成高亲和力受体复合物, 此复合物是细胞内信号转导所需的。IL-1 RAcP 和 IL-1 R2 作用形成的高亲和力受体复合物无生物功能, 不转导 IL-1 信号。然而, IL-1 R2 可作为诱饵受体来削减 IL-1 α 的功能 (16,30,31)。

IL-1 α 拥有广泛的生物学活性, 在介导免疫和炎症反应中起到重要作用。IL-1 α 的正常产生对于造血作用, 血管形成, 破骨细胞的分化, 受伤和感染的正常反应是至关重要的 (15,32-34)。

检测原理:

本实验采用双抗体夹心 ELISA 法。抗大鼠 IL-1 α 单抗包被于酶标板上, 加入标本、标准品和生物素化的抗大鼠 IL-1 α 抗体, 标本、标准品中的 IL-1 α 与包被于酶标板上的单抗和生物素化抗大鼠 IL-1 α 抗体结合, 形成免疫复合物, 游离的成分被洗去。加入辣根过氧化物酶标记的亲合素, 生物素与亲合素特异性结合, 游离的成分被洗去。加入显色剂, 若反应孔中有 IL-1 α , 辣根过氧化物酶会使无色的显色剂现蓝色, 加终止液变黄。在 450nm 处

测 OD 值, IL-1 α 浓度与 OD450 值之间呈正比, 可通过绘制标准曲线求出标本中 IL-1 α 浓度。

标本收集:

1. 收集血液的试管应为无热原和内毒素试管。
2. 血浆抗凝剂推荐 EDTA。
3. 避免溶血, 高血脂标本。
4. 标本应清澈透明, 悬浮物应离心去除。
5. 标本收集后若不及时检测, 请按一次用量分装, 冻存于-20 $^{\circ}$ C, 避免反复冻融。
6. 可根据实际情况, 将标本做适当倍数稀释(建议做预实验, 以确定稀释倍数)。

注: 正常大鼠血清或血浆样本建议做 1: 2 稀释。

试剂盒组成:

试剂盒组成	48 孔配置	96 孔配置	保存
说明书	1 份	1 份	
封板膜	2 片 (48)	4 片 (96)	
酶标包被板	1 \times 48	1 \times 96	2-8 $^{\circ}$ C
标准品	1 瓶	2 瓶	2-8 $^{\circ}$ C
标准品和标本稀释液	1 瓶	1 瓶	2-8 $^{\circ}$ C
浓缩生物素化抗体	1 瓶	2 瓶	2-8 $^{\circ}$ C
生物素化抗体稀释液	1 瓶	1 瓶	2-8 $^{\circ}$ C
浓缩酶结合物	1 瓶	2 瓶	2-8 $^{\circ}$ C (避光)
酶结合物稀释液	1 瓶	1 瓶	2-8 $^{\circ}$ C
浓缩洗涤液 20 \times	1 瓶	1 瓶	2-8 $^{\circ}$ C
显色剂	1 瓶	1 瓶	2-8 $^{\circ}$ C (避光)
终止液	1 瓶	1 瓶	2-8 $^{\circ}$ C

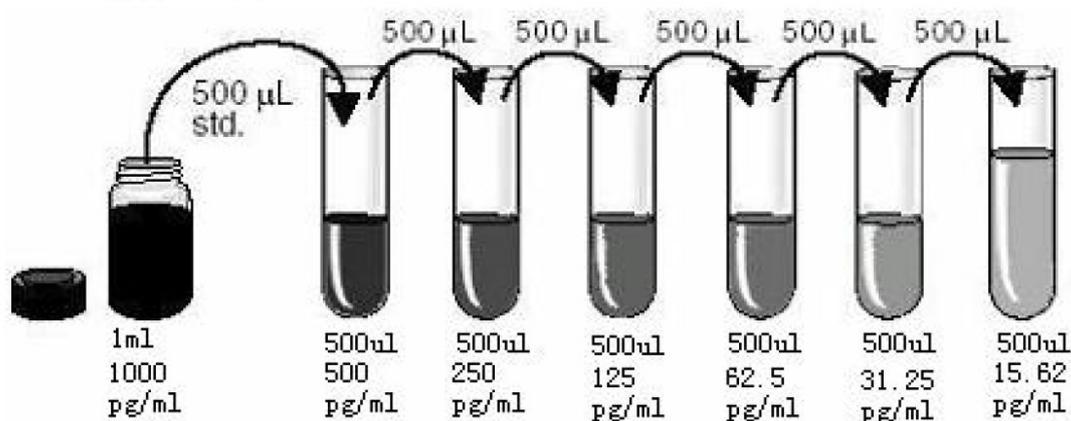
注意事项:

1. 试剂盒保存在 2-8 $^{\circ}$ C, 除复溶后的标准品, 其他成分不可冻结。
2. 浓缩生物素化抗体、浓缩酶结合物装量极少, 运输中颠簸和可能的倒置, 会使液体沾到管壁或瓶盖。因此使用前请用手甩几下或离心处理, 以使附着管壁或瓶盖的液体沉积到管底。
3. 从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶, 这属于正常现象, 加热使结晶完全溶解后再配制。
4. 若重复使用标准品应按照一次用量分装后, 将其放在-20~-70 $^{\circ}$ C 贮存。一次性使用, 避免反复冻融。
5. 不同批号的试剂盒组份不能混用。
6. 充分混匀对反应结果尤为重要, 最好使用微量振荡器(使用最低频率), 如无微量振荡器, 可在反应过程中每 10 分钟手工混匀一次。
7. 在试验中标准品和样本检测时建议作双复孔或三复孔。

检测前准备工作:

1. 请提前 20 分钟从冰箱中取出试剂盒, 以平衡至室温。
2. 将浓缩洗涤液用双蒸水稀释 (1:20)。未用完的放回 4℃。
3. 标准品: 加入标准品/标本稀释液 1ml 至冻干标准品中, 待彻底溶解后, 静置 15 分钟混匀 (浓度为 1000 pg/ml)。然后根据需要进行稀释。(建议标准曲线使用以下浓度: 1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625、0 pg/ml,)。复溶标准品若未用完请放入 -20℃ 保存, 稀释的标准品不得重复使用。

标准品稀释方法:



4. 生物素化抗体工作液: 以生物素化抗体稀释液稀释浓缩生物素化抗体 (1:100)。最好当日使用。
5. 酶结合物工作液: 以酶结合物稀释液 稀释浓缩酶结合物 (1:100)。最好当日使用。

洗涤方法:

1. 自动洗板机: 要求注入的洗涤液为 350ul, 注入与吸出间隔 15-30 秒。洗板 4 次。
2. 手工洗板: 甩尽孔内液体, 每孔加洗涤液 350ul, 静置 30 秒后甩尽液体, 在厚迭吸水纸上拍干。洗板 5 次。

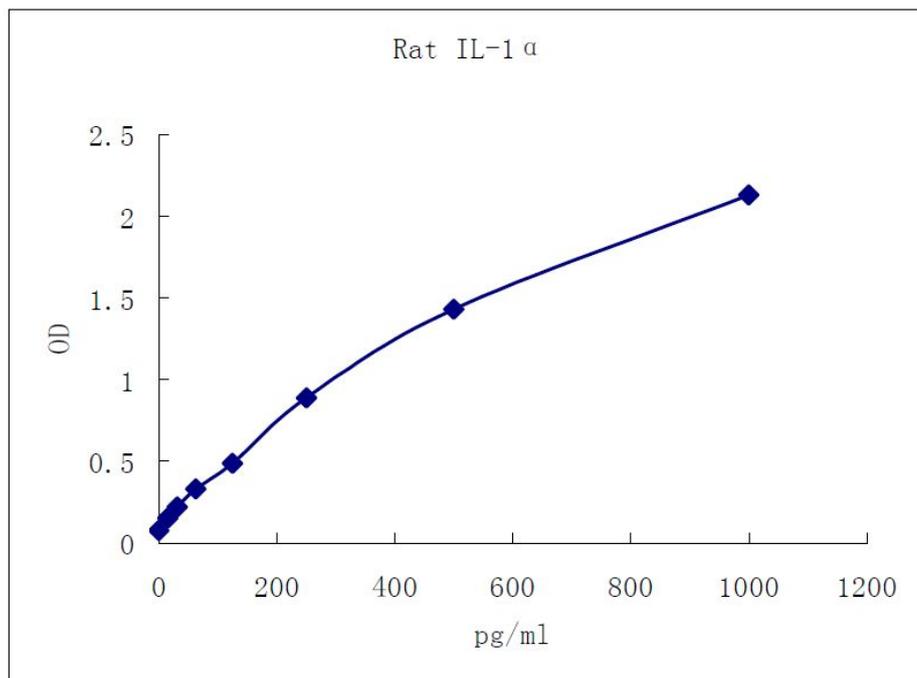
操作步骤:

1. 从已平衡至室温的密封袋中取出所需板条, 其它板条请密封放回 4℃。
2. 除空白孔外, 分别将标本或不同浓度标准品 (100ul/孔) 加入相应孔中; 加入生物素化抗体工作液 (50ul/孔)。用封板胶纸封住反应孔, 室温孵育 120 分钟。充分混匀对反应结果尤为重要, 要使用微量振荡器 (最低频率 700rpm)。
3. 洗板 4 次。
4. 除空白孔外, 加入酶结合物工作液 (100ul/孔)。用封板胶纸封住反应孔, 室温孵育 30 分钟。使用微量振荡器 (使用最低频率 700rpm)。
5. 洗板 4 次。
6. 加入显色剂 100ul/孔, 避光, 室温, 孵育 15-20 分钟。

7. 加入终止液 100ul/孔，混匀后即刻测量 OD450 值(5 分钟内)。

结果判断：

1. 每个标准品和标本的 OD 值应减去零孔的 OD 值。
2. 手工绘制标准曲线。以标准品浓度作横坐标，OD 值作纵坐标，以平滑线连接各标准品的坐标点。通过标本的 OD 值可在标准曲线上查出其浓度。
3. 若标本 OD 值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测，计算浓度时应乘以稀释倍数



注意：本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线计算标本含量。

灵敏度，特异性和重复性：

1. 灵敏度：最小可测大鼠 IL-1a 达 7pg/ml.
2. 特异性：不与 IL-1, 2, 4, 5, 6, 8, 12, IFN, TNF 及 sTNF-RII 等反应。
3. 重复性：板内，板间变异系数均<10%.