

# ELISA试剂盒使用说明书

## Mouse LIX ELISA Kit

全国统一热线：400-600-4213  
[www.biosharp.cn](http://www.biosharp.cn)

本试剂盒用于定量检测小鼠血清、血浆或细胞培养上清液等样本中天然和重组LIX浓度。使用前请仔细阅读说明书并检查试剂组分，如有任何疑问请与合肥兰杰柯科技有限公司联系，公司将为您提供强有力的技术支持。

## 目录

|                |   |
|----------------|---|
| 一、产品简介         | 2 |
| 二、检测原理         | 2 |
| 三、试剂盒组分        | 3 |
| 四、储存条件         | 3 |
| 五、注意事项         | 3 |
| 六、其它实验材料       | 4 |
| 七、使用说明         | 4 |
| 1、样品收集、处理及保存方法 | 4 |
| 2、试剂准备         | 4 |
| 3、操作步骤         | 5 |
| 4、操作流程图        | 6 |
| 5、操作要点提示       | 6 |
| 6、结果判断         | 6 |
| 八、常见问题分析及解决    | 8 |

# Mouse LIX (脂多糖诱导的cxc趋化因子) ELISA KIT

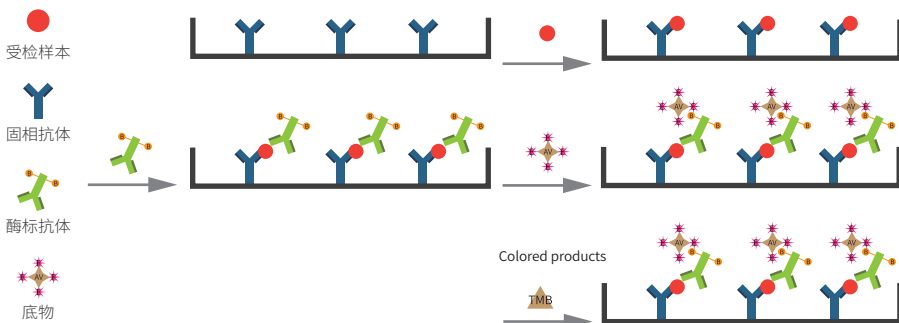
| 货号           | 名称                                  | 规格  |
|--------------|-------------------------------------|-----|
| BSEM-123-48T | Mouse LIX (脂多糖诱导的cxc趋化因子) ELISA KIT | 48T |
| BSEM-123-96T | Mouse LIX (脂多糖诱导的cxc趋化因子) ELISA KIT | 96T |

## 一、产品简介

LPS诱导的CXC趋化因子(LPS-induced CXC chemokine,LIX)是鼠趋化因子家族的一员。它由132aa组成, N端有一个分子量约为14 kDa的信号肽(aa 1-40)。LIX不是人的同源基因, 但跟人CXCL5/ENA-78和 CXCL6/GCP-2密切相关。LIX广泛表达, 由多种细胞分泌, 包括成纤维细胞、胸腺上皮细胞、血小板、血管内皮细胞和肝细胞。

## 二、检测原理

本实验采用双抗体夹心ELISA。用抗小鼠LIX单克隆抗体预包被酶标板, 加入适度稀释的样本和标准品, 其中的LIX会与其单抗结合, 洗去游离成分; 加入生物素化的抗小鼠LIX抗体, 抗小鼠LIX抗体与结合在单抗上的小鼠LIX结合而形成免疫复合物, 洗去游离的成分; 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, 洗去未结合的酶结合物; 加入显色剂, 若反应孔中有LIX, 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下测OD值, LIX浓度与OD<sub>450</sub>值之间呈正比, 可通过绘制标准曲线计算出标本中LIX浓度。



### 三、试剂盒组成

| 组分编号        | 组分         | 96t  | 48t | 储存条件  |
|-------------|------------|------|-----|-------|
| BSEM-123-1  | 标准品        | 2支   | 1支  | -20°C |
| BSEM-123-2  | 标准品和标本稀释液  | 2瓶   | 1瓶  | 2-8°C |
| BSEM-123-3  | 浓缩生物素化抗体   | 2支   | 1支  | 2-8°C |
| BSEM-123-4  | 生物素化抗体稀释液  | 1瓶   | 1瓶  | 2-8°C |
| BSEM-123-5  | 浓缩酶结合物(避光) | 2支   | 1支  | 2-8°C |
| BSEM-123-6  | 酶结合物稀释液    | 1瓶   | 1瓶  | 2-8°C |
| BSEM-123-7  | 浓缩洗涤液20×   | 1瓶   | 1瓶  | 2-8°C |
| BSEM-123-8  | 显色剂(避光)    | 1瓶   | 1瓶  | 2-8°C |
| BSEM-123-9  | 终止液        | 1瓶   | 1瓶  | 2-8°C |
| BSEM-123-10 | 抗体包被板条     | 8×12 | 8×6 | 2-8°C |
| BSEM-123-11 | 封板胶纸       | 4张   | 2张  | 2-8°C |
|             | 说明书        | 1份   | 1份  |       |

### 四、储存条件

未启封试剂盒2-8°C保存有效期6个月,启封后建议一个月内使用完毕。产品收到后标准品-20°C保存,其它组分2-8°C保存。

### 五、注意事项

- 1、试剂盒保存在2-8°C,除复溶后的标准品,其它成分不可冷冻。
- 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。使用前请离心处理以使附着于管壁或瓶盖的液体沉积到管底。
- 3、不同批号试剂不可混用。
- 4、为避免交叉污染请使用一次性吸头。
- 5、终止液和显色剂具腐蚀性,避免皮肤及粘膜直接接触,一旦接触到这些液体,请尽快用大量水冲洗。
- 6、使用干净的塑料容器配制洗涤液,使用前充分混匀试剂盒里的各种成份及样品。
- 7、洗涤酶标板时应充分拍干,不要将吸水纸直接放入酶标反应孔中吸水。
- 8、不要用其它来源的试剂混合或替代该产品的组分,不同批号的试剂盒组份不能混用,请在有效期内使用本产品。
- 9、在试验中标准品和样本检测时建议作双复孔或三复孔,加入试剂的顺序应一致,以保证所有反应孔孵育的时间一样。
- 10、充分混匀对反应结果尤为重要,最好使用微量振荡器(使用最低频率进行振荡)。
- 11、避免操作过程中酶标板干燥,干燥会使酶标板上生物成分迅速失活,影响实验结果。
- 12、适当的稀释样品,使样品值落在标准曲线范围内,根据待测因子含量高、中、低的不同,建议采用1:100、1:10、1:2稀释样品。如果样品OD值高于最高标准,适当增加稀释度并重复检测。
- 13、标准品稀释液,操作人,移液方式,洗涤方法,孵育时间及温度,试剂盒批次的不同均可能会导致结果的差异。
- 14、此法可有效的消除可溶性受体、结合蛋白以及生物样品中的其他因素的干扰。

## 六、其它实验材料

1. 酶标仪(450 nm)
2. 高精度可调移液器及吸头: 0.5-10, 2-20, 20-200, 200-1000  $\mu\text{L}$ ; 一次检测样品较多时, 最好用多通道移液器
3. 自动洗板机或洗瓶
4. 37°C温箱
5. 双蒸水或去离子水
6. 坐标纸
7. 量筒

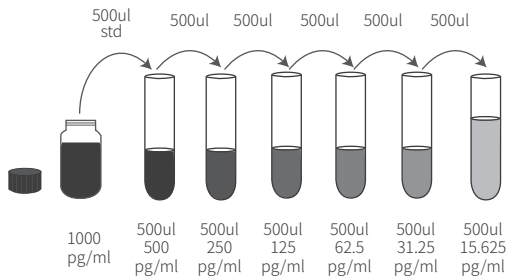
## 七、使用说明

### 7.1 样品收集、处理及保存方法

1. 血清: 使用不含热原和内毒素的试管, 收集血液后, 室温凝血30 min, 1000 $\times$ g离心10 min, 小心分离血清。
2. 血浆: 用EDTA、柠檬酸盐、肝素作为抗凝剂收集血浆, 收集后30min内以1000 $\times$ g离心15min去除颗粒。
3. 细胞上清液: 1000 $\times$ g离心10 min去除颗粒和聚合物。
4. 保存: 若样品不立即检测, 请将其按一次用量分装, -20°C~-70°C保存, 避免反复冻融。尽量避免使用溶血或高血脂样本。如果血清中含有大量颗粒, 检测前先离心或过滤去除; 室温下解冻, 请勿于37°C或更高的温度加热解冻。
5. 稀释: 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)。

### 7.2 试剂准备

1. 提前30 min从冰箱中取出试剂盒, 平衡至室温。
2. 洗涤缓冲液: 从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶, 这属于正常现象, 加热并轻轻摇晃使结晶完全溶解后再配制。将浓缩洗涤液用双蒸水稀释(1:20)。未用完的放回4°C。
3. 标准品: 加入标准品/标本稀释液1.0mL至冻干标准品中, 待彻底溶解后, 静置15分钟混匀(浓度为1000pg/mL), 然后根据需要进行稀释, 见下图(建议标准曲线使用以下浓度: 1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625、0pg/mL)稀释的标准品不得重复使用, 应按照一次用量分装后, 将其放在-20~-70°C贮存, 一次性使用, 避免反复冻融。



标准品稀释方法

4. 生物素化抗体工作液: 根据每孔需要100 $\mu$ L来计算总的用量, 多配制100-200 $\mu$ L。以生物素化抗体稀释液稀释浓缩生物素化抗体(1:100)。最好现用现配。

#### 浓缩生物素化抗体稀释方法

| 所用板条数 | 浓缩生物素化抗     | + | 生物素化抗体稀释液     |
|-------|-------------|---|---------------|
| 12    | 110 $\mu$ L | + | 10890 $\mu$ L |
| 10    | 90 $\mu$ L  | + | 8910 $\mu$ L  |
| 8     | 70 $\mu$ L  | + | 6930 $\mu$ L  |
| 6     | 50 $\mu$ L  | + | 4950 $\mu$ L  |
| 4     | 33 $\mu$ L  | + | 3267 $\mu$ L  |
| 2     | 17 $\mu$ L  | + | 1683 $\mu$ L  |
| 1     | 9 $\mu$ L   | + | 891 $\mu$ L   |

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)。最好现用现配。

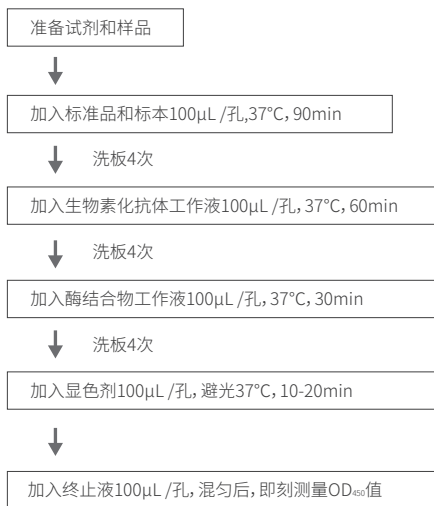
#### 浓缩酶结合物稀释方法

| 所用板条数 | 浓缩酶结合物      | + | 酶结合物稀释液       |
|-------|-------------|---|---------------|
| 12    | 110 $\mu$ L | + | 10890 $\mu$ L |
| 10    | 90 $\mu$ L  | + | 8910 $\mu$ L  |
| 8     | 70 $\mu$ L  | + | 6930 $\mu$ L  |
| 6     | 50 $\mu$ L  | + | 4950 $\mu$ L  |
| 4     | 33 $\mu$ L  | + | 3267 $\mu$ L  |
| 2     | 17 $\mu$ L  | + | 1683 $\mu$ L  |
| 1     | 9 $\mu$ L   | + | 891 $\mu$ L   |

## 7.3 操作步骤

1. 按照上述准备工作配制好各种溶液。
2. 根据待测样品数量和标准品的数量决定所需的板条数, 并增加1孔作为空白对照孔。分别将标本和不同浓度标准品(100 $\mu$ L/孔)加入相应孔中(零孔只加标准品/样本稀释液), 用封板胶纸封住反应孔, 37 $^{\circ}$ C解箱孵育90分钟(空白对照孔除外)。
3. 洗板4次: (1)自动洗板机: 要求注入的洗涤液为350  $\mu$ L, 注入与吸出间隔15-30秒。(2)手工洗板: 甩尽孔内液体, 每孔加洗涤液350 $\mu$ L, 静置30秒后甩尽液体, 在厚透吸水纸上拍干。
4. 加入生物素化抗体工作液(100  $\mu$ L/孔)。用封板胶纸封住反应孔, 37 $^{\circ}$ C解箱孵育60分钟(空白对照孔除外)。
5. 洗板4次。
6. 加入酶结合物工作液(100  $\mu$ L/孔)。用封板胶纸封住反应孔, 37 $^{\circ}$ C解箱孵育30分钟(空白对照孔除外)。
7. 洗板4次。
8. 加入显色剂100  $\mu$ L/孔, 避光, 37 $^{\circ}$ C解箱孵育10-20分钟。
9. 加入终止液100  $\mu$ L/孔, 混匀后即刻测量OD<sub>450</sub>值(5分钟内)。

## 7.4 操作流程图



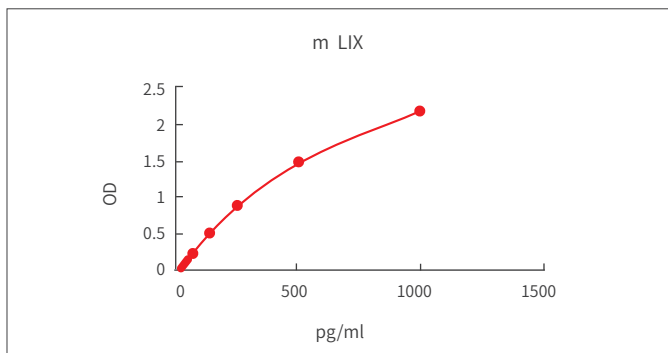
## 7.5 操作要点提示

- 1、配制各种试剂时要充分混匀, 但要避免产生大量泡沫, 以免加样时加入大量的气泡, 产生加样误差。
- 2、为避免交叉污染, 在加入不同浓度的标准品、不同样品、不同试剂时谨记及时更换吸头。
- 3、为了确保准确的结果, 在每次孵育前均需使用新封板胶纸封住反应孔。
- 4、显色剂在添加之前, 应保持无色, 请勿使用已变为蓝色的显色溶液。最佳显色时间对标准曲线很重要, 肉眼可见前3-4孔有梯度蓝色, 后3-4孔差别不明显, 零孔无蓝色出现即可终止。
- 5、每次检测均要做标准曲线, 根据样品待测因子的含量, 适当稀释或浓缩样本, 最好做预实验。

## 7.6 结果判断

- 1、每个标准品和标本的OD值应减去空白孔的OD值, 如果做复孔, 求其平均值。
- 2、使用计算机软件以吸光度OD值为纵坐标(Y), 相应的LIX标准品浓度为横坐标(X), 生成相应的标准曲线, 样品的LIX含量可根据其OD值由标准曲线换算出相应的浓度。
- 3、若标本OD值高于标准曲线上限, 应当适当稀释后重测, 计算浓度时应乘以稀释倍数算标本含量。
- 4、参考数据:

| 标准品浓度(pg/mL) | OD值1  | OD值2  | 平均值   | 矫正值   |
|--------------|-------|-------|-------|-------|
| 0            | 0.019 | 0.018 | 0.019 | —     |
| 15.625       | 0.069 | 0.064 | 0.067 | 0.048 |
| 31.25        | 0.131 | 0.139 | 0.135 | 0.116 |
| 62.5         | 0.275 | 0.265 | 0.270 | 0.251 |
| 125          | 0.503 | 0.497 | 0.500 | 0.481 |
| 250          | 0.864 | 0.866 | 0.865 | 0.846 |
| 500          | 1.427 | 1.431 | 1.429 | 1.410 |
| 1000         | 2.299 | 2.303 | 2.301 | 2.282 |



注:本图仅供参考,应以同次试验标准品所绘标准曲线为准

**结果重复性:**

板间,板内变异系数均<10%。

**灵敏度:**

最低检测小鼠LIX剂量小于7pg/mL。最低检出量测定方法:20个零标准的平均OD值增加两个标准差,再计算相应的浓度。

**特异性:**

此试剂盒可检测天然和重组的小鼠LIX,以50 ng/mL平行做特异性试验,均不与下列细胞因子及蛋白反应。

| 重组小鼠细胞因子       | 重组人细胞因子 | 重组大鼠细胞因子 |
|----------------|---------|----------|
| BLC/BCA-1      | GCP-2   | LIX      |
| I-TAC          |         |          |
| MIG            |         |          |
| PF-4           |         |          |
| SDF-1 $\alpha$ |         |          |
|                |         |          |
|                |         |          |
|                |         |          |
|                |         |          |
|                |         |          |
|                |         |          |
|                |         |          |
|                |         |          |
|                |         |          |
|                |         |          |
|                |         |          |
|                |         |          |
|                |         |          |
|                |         |          |

## 八、常见问题分析及解决

| 问题                         | 可能原因                                  | 解决办法  |
|----------------------------|---------------------------------------|---|
| 无颜色                        | 不同试剂盒或不同批号的试剂混合                       | 重新检查试剂的标签, 确保所有组分都属于正使用的试剂盒中的。不能混用不同试剂盒或不同批号的试剂。  |
|                            | 漏加酶                                   | 检查操作流程, 注意不要漏加  |
|                            | HRP酶污染了叠氮钠<br>试剂配制/使用有误               | 使用新配制的试剂, 禁含叠氮钠<br>重做试验, 严格按说明书操作, 每次配制和使用前看清标签   |
| 显色弱                        | 超过有效期的产品可能会产生很弱的信号                    | 检查产品有效期   |
|                            | 缩短孵育时间能使实验信号变弱                        | 检查孵育时间  |
|                            | 使用了被污染的试剂                             | 检查试剂是否被污染   |
|                            | 仪器设定不正确, 滤光片不匹配                       | 仪器是否设定正确, 滤光片的使用等   |
|                            | 洗涤操作不规范                               | 洗涤不充分, 使用手工洗板常出现<br>洗瓶洗涤, 每孔应完全充满洗涤缓冲液, 倾出时应迅速<br>若用洗板机, 应校准并设定足够充满每孔的体积量。板内侧不应接触设备<br>检查每孔是否有残留的洗液或每孔加样量的体积是否准确<br>可在两次洗板之间加30秒的浸泡 |
| 高背景                        | 实验中孵育温度和时间不适当                         | 确定每一试验步骤的孵育温度和时间是否适当  |
|                            | 酶过量过多                                 | 加酶前检查移液器调节量是否准确<br>检查稀释度, 必要时进行效价测定   |
| 全部板子变成规则的蓝色                | 不充分的洗涤/洗涤步骤被遗漏使没结合的HRP仍有残留            | 最好使用洗板机充分洗涤<br>检查每孔是否有残留的洗液或加样量是否准确   |
|                            | 太多的酶结合物                               | 检查稀释度, 必要时进行效价测定  |
| 高CV值花板                     | 封板膜或试剂容器被重复使用, 导致HRP残留, 使TMB底物产生非特异蓝色 | 使用新封板膜, 每步使用不同的试剂容器   |
|                            | 操作不慎或洗涤不充分                            | 按说明书洗板、加样和显色, 洗板尤为重要  |
|                            | 出现干板, 没有使用封板膜、封板膜重复使用                 | 确定每两步骤间酶标板应保持湿润<br>使用封板膜封口, 注意每步使用新鲜的封板膜  |
| 标准曲线可得到, 但两点之间区别很差(低或平的曲线) | 移液器不准确, 吸头重复使用                        | 检查并校准移液器, 每次取样必须更换吸头  |
|                            | 酶结合物不足                                | 检查稀释度, 必要时进行效价测定  |
|                            | 检测抗体不足                                | 检查稀释度, 必要时进行效价测定  |
|                            | 板子显色不足                                | 延长底物孵育时间<br>使用推荐品牌的底物溶液   |
| 标准曲线很好, 但没有任何期望的阳性信号       | 标本中无相应的待检测物质                          | 使用内参对照<br>重复实验, 重新考虑实验的相应参数   |
|                            | 标本基质遮盖检测                              | 将标本至少做1:2相应的稀释, 或进行系列稀释   |
| 标准曲线很好, 但标本的判读值很高          | 标本中含的待检物质水平超过实验范围                     | 稀释标本  |
| 边缘效应                       | 工作环境温度不均衡                             | 避免将板子在变化温度环境中孵育   |
| 漂移                         | 实验过程中出现间断                             | 整个实验应连续操作, 在实验开始前将所有的标准品和标本做适当的准备。  |
|                            | 试剂没有按说明书平衡至室温                         | 在所有试剂加入孔前, 确保它们已平衡至室温, 除非说明书中有另外的要求。  |
|                            | 是否可更改试剂盒所提供的操作步骤?                     | 一般厂商为确保最高的灵敏度, 对试剂盒都进行了优化, 为确保每一试剂盒实验的规范性应按说明书操作。   |
|                            | 是否可混用不同批次试剂盒中的试剂?                     | 不可以, 绝大多数试剂在每批试剂盒中是特异的, 若有问题可与厂家或代理商联系。   |
|                            | 是否可增加或减少标本的体积?                        | 商品化的试剂盒所需加入的标本体积是优化的, 应按说明书操作, 不建议更改所加标本体积。   |
|                            | 是否可重新确定自己的标准曲线的点?                     | 可以。说明书上有建议制备标准曲线时标准品的稀释度, 可改变稀释倍数和增加曲线的点, 但是必须在实验范围内, 高于试剂盒中最高标准品的点和低于灵敏度以下的点是无效的。  |



# 实际加样情况表

|   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |