

# Human IL-23 ELISA 试剂盒

产品编号# CHE0008 (48/96 孔)

适用于人血清、血浆或细胞培养上清液等样本

仅供研究，不用于临床诊断。



客服热线: 400-7060-959 \* 技术支持邮箱: [tech@4abio.com](mailto:tech@4abio.com)  
公司官网: [www.4abio.net](http://www.4abio.net)

## 目录

|                   |        |
|-------------------|--------|
| 简介 .....          | - 3 -  |
| 检测原理 .....        | - 3 -  |
| 试剂盒组分 .....       | - 4 -  |
| 储存条件 .....        | - 5 -  |
| 其他实验材料 .....      | - 5 -  |
| 注意事项 .....        | - 5 -  |
| 样本收集处理及保存方法 ..... | - 6 -  |
| 试剂准备 .....        | - 6 -  |
| 操作步骤 .....        | - 8 -  |
| 操作流程图 .....       | - 8 -  |
| 操作要点提示 .....      | - 9 -  |
| 结果判断 .....        | - 9 -  |
| 结果重复性 .....       | - 10 - |
| 灵敏度 .....         | - 10 - |
| 特异性 .....         | - 10 - |
| 参考文献 .....        | - 10 - |

 该产品由北京四正柏生物科技有限公司研制。

 请根据试剂盒中所附说明书指引进行实验。

## 简介

白细胞介素-23 (IL-23) 是 2000 年新发现的异二聚体细胞因子(1-3)。人 IL-23 是由 p19 和 IL-12 中的 P40 两个亚基组成，它们之间通过二硫键相联结。P19 是 Oppmann 等发现的衍生于 IL-6 细胞因子家族的新细胞因子。p19 的 cDNA 编码 189 个氨基酸残基的蛋白前体。人和鼠的 p19 相应蛋白质中均含有 5 个半胱氨酸残基，无 N-糖基化位点，两者有 70% 的同源性。其蛋白质组成大部分与 IL-12p35、IL-6 和 G-CSF 相近。

IL-23 受体是由 IL-12 受体  $\beta 1$  亚基 (IL-12 R $\beta 1$ ) 和 IL-23 受体 (IL-23 R) 两个亚基组成。IL-23 可由多种组织及细胞产生，如鼠的 Th1 细胞和活化的巨噬细胞 (MP)、鼠和人外周血单核细胞的树突状细胞 (DC)。

IL-23 是一个具有多种生物学功能的细胞因子，可对多种细胞发挥作用，促进细胞因子的分泌，产生相应的细胞效应。IL-23 可作用于鼠记忆性 T 细胞，促进其强烈增殖。IL-23 可以诱导 T 细胞产生 IFN $\gamma$ 、IL-17、IL-10 多种细胞因子。DC 和 MP 可以分泌 IL-23，在这两种细胞上又存在 IL-23R，这提示 IL-23 可以通过自分泌的方式对这两种细胞发挥作用。IL-23 可以通过调节中性粒细胞调节细胞控制 IL-17 的分泌，从而调节粒细胞的生成。

IL-23 在多种疾病中发挥作用，IL-23 能够促进自身免疫反应，引起自身免疫性疾病。IL-23 在关节自身免疫炎症中，也是一个促进因子。如在风湿性关节炎中，IL-23 促进 IL-17 的分泌。从而导致了关节的破坏。IL-23 具有抗肿瘤及抗肿瘤转移作用。IL-23 还具有抗多种细菌感染的作用，在 HIV 感染者中，IL-23 还可能具有避免机会致病菌感染的作用。此外，在新型隐球菌、结核杆菌、弓形虫感染中，当 IL-12 缺陷时，IL-23 可补充 IL-12 在抗感染中的作用。

## 检测原理

本实验采用双抗体夹心 ELISA。用抗人 IL-23 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 IL-23 会与其单抗结合，洗去游离成分；加入生物素化的抗人 IL-23 抗体，抗人 IL-23 抗体与结合在单抗上的人 IL-23 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 IL-23，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，IL-23 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 IL-23 浓度。



检测原理示意图

## 试剂盒组分

| 试剂盒组分         | 96 孔 | 48 孔 | 配制        |
|---------------|------|------|-----------|
| 1a 标准品        | 2 支  | 1 支  | 按说明书进行稀释  |
| 1b 标准品和标本稀释液  | 1 瓶  | 1 瓶  | 即用型       |
| 2a 浓缩生物素化抗体   | 2 支  | 1 支  | 按瓶签标识进行稀释 |
| 2b 生物素化抗体稀释液  | 1 瓶  | 1 瓶  | 即用型       |
| 3a 浓缩酶结合物（避光） | 2 支  | 1 支  | 按瓶签标识进行稀释 |
| 3b 酶结合物稀释液    | 1 瓶  | 1 瓶  | 即用型       |
| 4 浓缩洗涤液 20×   | 1 瓶  | 1 瓶  | 按瓶签标识进行稀释 |
| 显色剂（避光）       | 1 瓶  | 1 瓶  | 即用型       |
| 终止液           | 1 瓶  | 1 瓶  | 即用型       |
| 抗体包被板条        | 8×12 | 8×6  | 即用型       |
| 封板胶纸          | 4 张  | 2 张  | 即用型       |
| 说明书           | 1 份  | 1 份  |           |

如果您收到试剂盒后发现上表中有任何组分破损或缺失,请及时联系我司客服 400-7060-959 或 [tech@4abio.com](mailto:tech@4abio.com)。我们将及时为您解决相关问题。

## 储存条件

|             |                              |  |
|-------------|------------------------------|--|
| 未启封的试剂盒     | 4℃保存，请于保质期内使用。               |  |
| 已启封或重新溶解的试剂 | 1b 标准品和标本稀释液                 | 可以整盒放入 4℃储存 1 个月。<br>2a 浓缩生物素化抗体和 3a 浓缩酶结合物需用现配。 |
|             | 2a 浓缩生物素化抗体 (100×)           |  |
|             | 2b 生物素化抗体稀释液                 |  |
|             | 3a 浓缩酶结合物 (避光 100×)          |  |
|             | 3b 酶结合物稀释液                   |  |
|             | 4 浓缩洗涤液 20×                  |  |
|             | 显色剂 (避光)                     |  |
|             | 终止液                          | 4℃或常温保存  |
|             | 标准品                          | 重溶后分装，-20℃存放一个月，避免反复冻融。稀释后的标准品使用后应丢弃，不得重复使用。     |
| 抗体包被板条      | 实验中不用的板条应立即放回包装袋中，密封干燥 4℃保存。 |  |

以上储存条件均要求在试剂盒保质期内。

## 其他实验材料 (不提供，但可协助购买)：

1. 酶标仪(450nm)
2. 高精度可调移液器及吸头: 0.5-10, 2-20, 20-200, 200-1000 $\mu$ 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℃温箱
5. 双蒸水或去离子水
6. 坐标纸
7. 量筒

## 注意事项

1. 试剂盒保存在2-8℃，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(2a)、浓缩酶结合物(3a)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. 为避免交叉污染请使用一次性吸头。
4. 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。
5. 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。
6. 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。

7. 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，请在有效日期内使用本产品。
8. 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。
9. 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)。
10. 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。
11. 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。
12. 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。
13. 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。

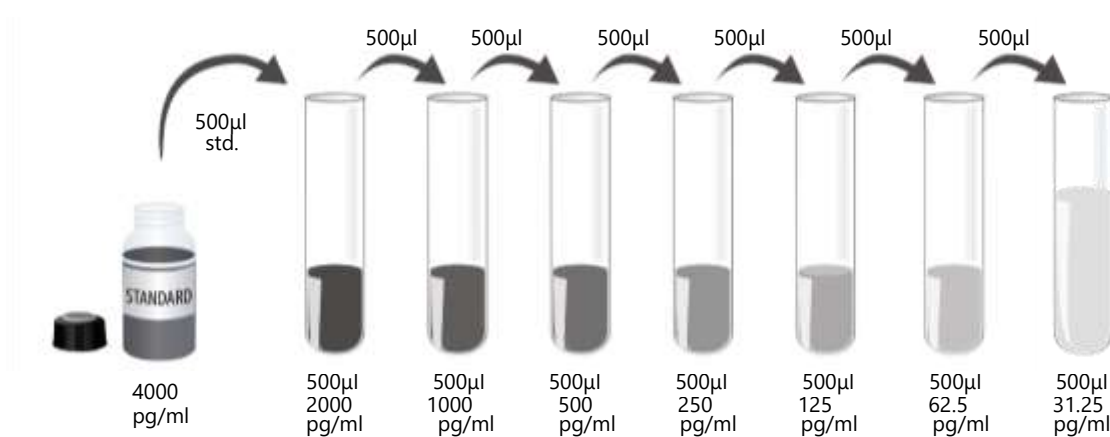
## 样本收集处理及保存方法

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30min，1000×g离心10min，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×g离心15min去除颗粒。
3. **细胞上清液**：1000×g离心10min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℃-70℃保存，避免反复冻融。尽量避免使用溶血或高脂样本。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℃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)。  
**注：正常人血清或血浆样本建议做1:2稀释。**

## 试剂准备

1. 提前30min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℃。
3. **标准品**：加入标准品/标本稀释液(1b)1.0ml至冻干标准品(1a)中，待彻底溶解后，静置15分钟混匀(浓度为4000pg/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：2000、1000、500、250、125、62.5、31.25、0 pg/ml)。稀释的标准品不得重复使用，未用完的标准品应按照一次用量分装后，将其放在-20~-70℃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100µl来计算总的用量，多配制100-200µl。以生物素化抗体稀释液(2b)稀释浓缩生物素化抗体(2a)(1:100)。最好现用现配。（稀释方法参照下表）

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

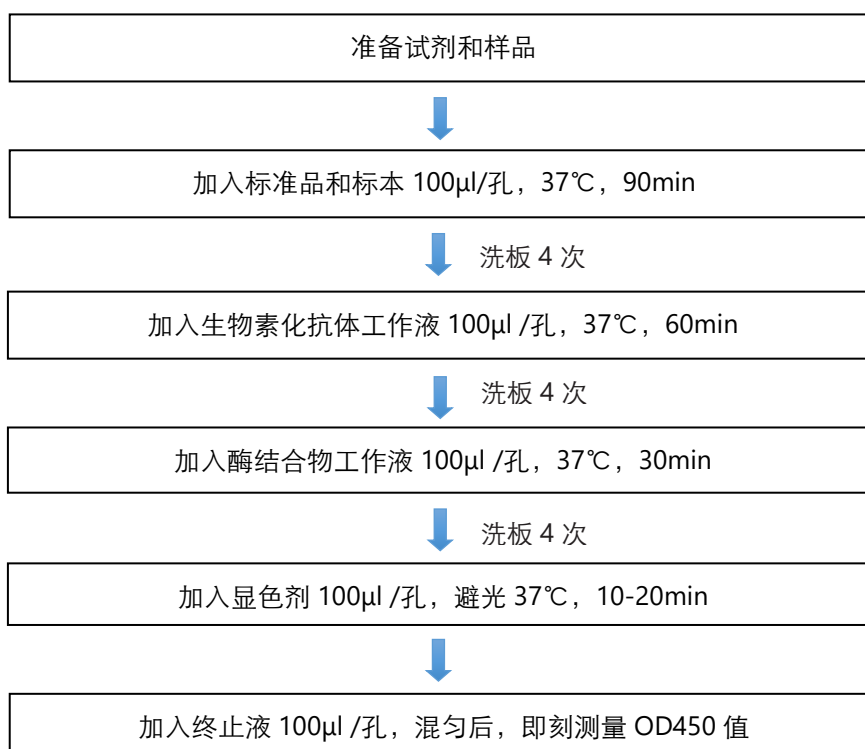
5. **酶结合物工作液：**以酶结合物稀释液(3b) 稀释浓缩酶结合物(3a)(1:100)。最好现用现配。（稀释方法参照下表）

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

## 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孵箱孵育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，在厚迭吸水纸上拍干。
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孵箱孵育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孵箱孵育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孵箱孵育10-20分钟。
9. 加入终止液100 $\mu$ l /孔，混匀后即刻测量OD450值(5分钟内)。

## 操作流程圖





## 操作要点提示

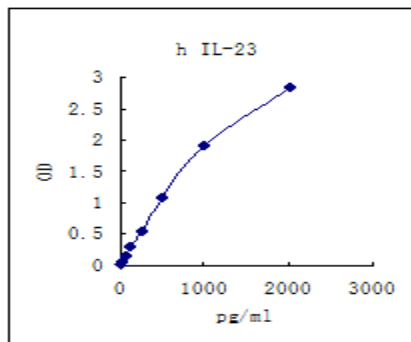
1. 配制各种试剂时要充分混匀，但要避免产生大量泡沫，以免加样时加入大量的气泡，产生加样误差。
2. 为避免交叉污染，在加入不同浓度的标准品、不同样品、不同试剂时谨记及时更换吸头。
3. 为了确保准确的结果，在每次孵育前均需使用新封板胶纸封住反应孔。
4. 显色剂在添加之前，应保持无色，请勿使用已变为蓝色的显色溶液。最佳显色时间对标准曲线很重要，肉眼可见前 3-4 孔有梯度蓝色，后 3-4 孔差别不明显，零孔无蓝色出现即可终止。
5. 每次检测均要做标准曲线，根据样品待测因子的含量，适当稀释或浓缩样本，最好做预实验。

## 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IL-23标准品浓度为横坐标(X)，生成相应的标准曲线，样品的IL-23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 | 0.021 | 0.020 | —     |
| 31.25        | 0.077 | 0.070 | 0.073 | 0.053 |
| 62.5         | 0.162 | 0.167 | 0.165 | 0.145 |
| 125          | 0.311 | 0.323 | 0.317 | 0.297 |
| 250          | 0.561 | 0.534 | 0.547 | 0.527 |
| 500          | 1.099 | 1.100 | 1.099 | 1.079 |
| 1000         | 1.905 | 1.896 | 1.900 | 1.880 |
| 2000         | 2.821 | 2.857 | 2.839 | 2.819 |

数据仅供参考，不同用户最佳显色时间会有所不同



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

最低检测人 IL-23 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人IL-23，以50ng/ml平行做特异性试验，均不与下列细胞因子及蛋白反应。

| 重组人细胞因子        | 重组小鼠细胞因子 | 重组大鼠细胞因子 |
|----------------|----------|----------|
| CD40 Ligand    | IL-6     | CNTF     |
| CT-1           | IL-10    | G-CSF    |
| CTLA-4         | IL-11    | IL-6     |
| G-CSF          | IL-12    | OSM      |
| IL-6 sR        | IL-13    |          |
| IL-6 sR/sgp130 |          |          |
| IL-9           |          |          |
| IL-10          |          |          |
| IL-12          |          |          |
| LIF            |          |          |
| LIF R          |          |          |
| OSM            |          |          |

## 参考文献

1. Hunter, C.A.(2005) Nat.Rev. Immunol. 5:521.
2. Langrish, C.L. et al (2004) Immunol. Rev. 202: 96.

3. Mckenzie, B.S.et al. (2006) Trends Immunol. 27:17
4. Aggarwal, S. et al. (2003) J. Biol. Chem. 278:1910.
5. Cua, D.J. et al. (2003) Nature 421:744.
6. Oppmann, B. et al. (2000) Immunity 13: 715.
7. Parham, C. et al. (2002) J. Immunol. 168:5699.
8. Langrish, C.L. et al. (2005) J. Exp.Med. 201:233.
9. Cugno M. et al. (2009) Trends Mol Med. 15: 69.