

# Human IL-12p70 ELISA 试剂盒

产品编号# CHE0015 (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 12(IL-12)，也称为自然杀伤细胞刺激因子或细胞毒性淋巴细胞成熟因子，是一种多效性细胞因子，主要由活化的巨噬细胞、树突状细胞和中性粒细胞产生，有致炎作用和免疫调节作用。1982 年 Wagner 等发现在丝裂原刺激小鼠淋巴细胞的培养液中存在一种不同于 IL-2 的细胞因子，这种细胞因子在体外能与 IL-2 协同促进鼠 CTL 应答。1986 年在人混合淋巴细胞培养(MLC)或 PHA 活化的 PBMC 培养上清中也发现了与此类似的因子，称为 CTL 成熟因子 (CLMF)。1991 年 Gubler 等将 CLMF cDNA 克隆并表达成功，表明是一种新的细胞因子，遂将 CLMF 命名为 IL-12。

IL-12 是由二硫键相连异源二聚体，70 kDa 的 (p70) 异二聚体糖蛋白由 40 kDa (p40) 和 35 kDa (p35) 两个亚基组成。p40 和 p35 亚基没有 IL-12 的活性，但 p40 同型二聚体可与 IL-12 的受体结合，是 IL-12 的拮抗剂。IL-12 等电点为 pH4.5~5.5。人 IL-12 P35 亚单位有 197 个氨基酸残基，含 7 个半胱氨酸和 3 个 N 糖基化位点，P40 亚单位有 306 个氨基酸残基，含 10 个半胱氨酸和 4 个 N 糖基化位点。人类 p40 和 p35 分别在染色体 5 和 3 上。人 IL-12 作用有种族特异性，人 IL-12 对小鼠细胞作用甚微。

IL-12 的生物学功能包括体外效应和体内效应：

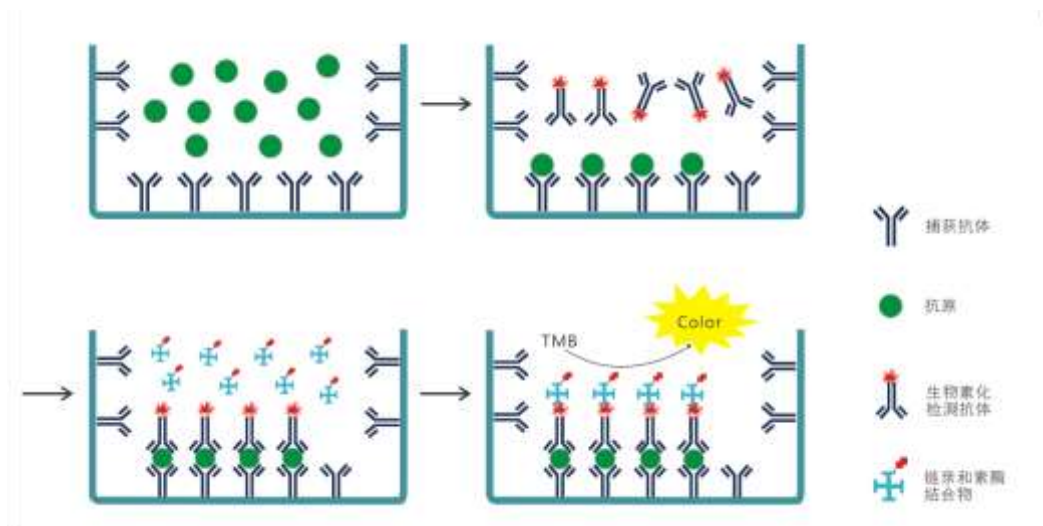
IL-12 的体外效应：IL-12 能诱导 PHA 刺激的 T 细胞增殖。IL-12 能增加 CD56 + NK 细胞的活性；诱导 NK 细胞或 PBMC 增殖和产生 LAK 活性，增加 NK 细胞表达表面分子；促进 NK 细胞产生 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  (TGF- $\beta$  和 IL-10 抑制该效应)。IL-12 在 BCG 和 LPS 诱导的小鼠炎性休克所致的死亡中起重要作用。IL-12 通过诱导 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$ ，抑制骨髓造血。IL-12 还有抗血管生成作用。

IL-12 的体内效应：将 IL-12 输入动物体内可以增强 NK 细胞的杀伤活性、增加 IFN- $\gamma$  分泌、启动造血细胞大量生成、增强异体排斥反应并可能介导抗肿瘤效应。IL-12 在某些 Th1 介导的自身免疫疾病中起重要作用。IL-12 诱导动物脾肿大，其中含有大量造血细胞，红细胞系、髓样细胞系和巨核细胞系都增加。IL-2 抑制骨髓造血的作用可能与诱导 NK 细胞产生 IFN- $\gamma$  等有关。在小鼠肿瘤模型中，IL-12 的抗肿瘤作用依赖 IFN- $\gamma$  的增加，且与 IL-2、IFN- $\alpha$  以及一些化学治疗药物有协同抗肿瘤作用。

IL-12 发挥生物学效应所需的细胞因子浓度很低( $\leq$ pM)，与合适剂量 IL-2 联合应用可降低 IL-2 用量，同时提高 CTL、NK、LAK 的杀伤活性，因此 IL-12 可能成为一种新的抗肿瘤生物制剂。

## 检测原理

本实验采用双抗体夹心 ELISA。用抗人 IL-12p70 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-12p70 会与其单抗结合，洗去游离成分；加入生物素化的抗人 IL-12p70 抗体，抗人 IL-12p70 抗体与结合在单抗上的人 IL-12p70 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-12p70，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-12p70 浓度与 OD450 值之间呈正比，可通过绘制标准曲线计算出标本中 IL-12p70 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><br>2a 浓缩生物素化抗体和 3a 浓缩酶结合物需现用现配。 |
|             | 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, 200-1000μl; 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。

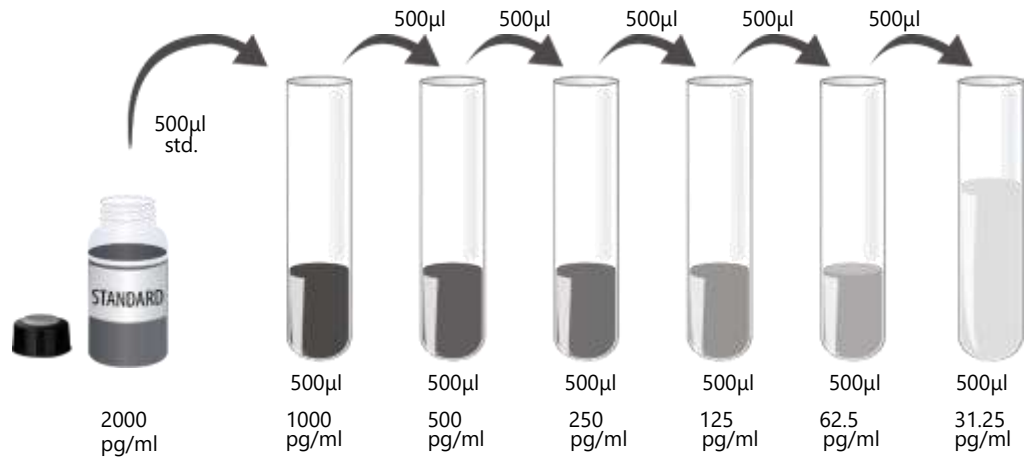
## 样本收集处理及保存方法

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2000pg/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   |

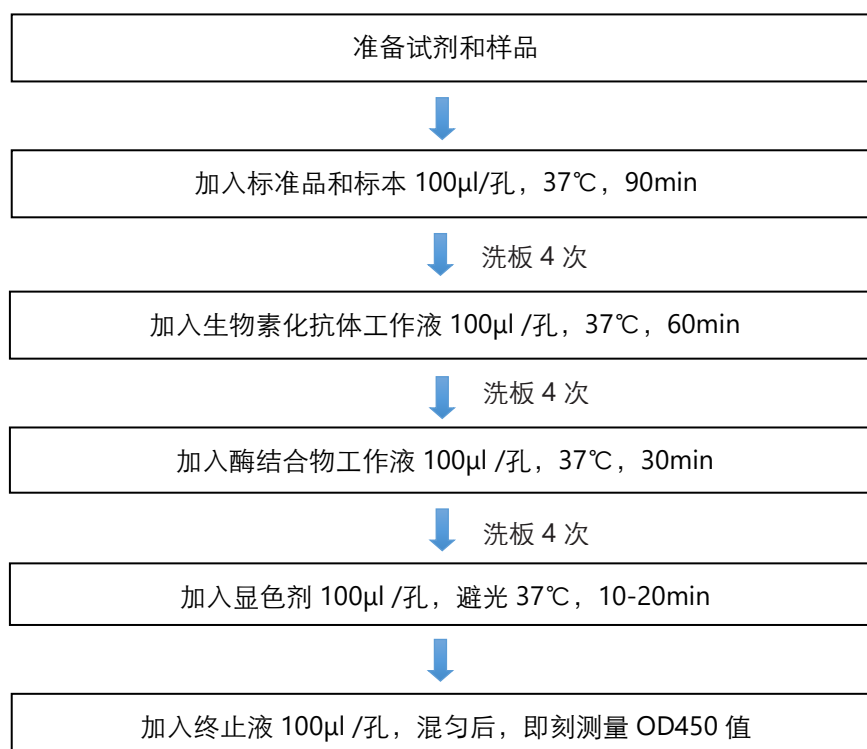
5. **酶结合物工作液：**以酶结合物稀释液(3b) 稀释浓缩酶结合物(3a)(1:100)。最好现用现配。（稀释方法参照下表）

| 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℃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℃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℃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℃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

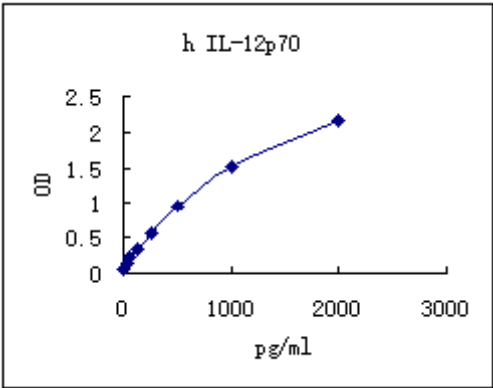
- 1. 配制各种试剂时要充分混匀，但要避免产生大量泡沫，以免加样时加入大量的气泡，产生加样误差。
- 2. 为避免交叉污染，在加入不同浓度的标准品、不同样品、不同试剂时谨记及时更换吸头。
- 3. 为了确保准确的结果，在每次孵育前均需使用新封板胶纸封住反应孔。
- 4. 显色剂在添加之前，应保持无色，请勿使用已变为蓝色的显色溶液。最佳显色时间对标准曲线很重要，肉眼可见前 3-4 孔有梯度蓝色，后 3-4 孔差别不明显，零孔无蓝色出现即可终止。
- 5. 每次检测均要做标准曲线，根据样品待测因子的含量，适当稀释或浓缩样本，最好做预实验。

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-12p70标准品浓度为横坐标(X)，生成相应的标准曲线，样品的IL-12p70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            | 0.058 | 0.052 | 0.055 | —     |
| 31.25        | 0.133 | 0.129 | 0.131 | 0.076 |
| 62.5         | 0.215 | 0.211 | 0.213 | 0.158 |
| 125          | 0.332 | 0.328 | 0.330 | 0.275 |
| 250          | 0.562 | 0.568 | 0.565 | 0.510 |
| 500          | 0.956 | 0.961 | 0.959 | 0.904 |
| 1000         | 1.524 | 1.528 | 1.526 | 1.471 |
| 2000         | 2.150 | 2.168 | 2.159 | 2.104 |

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-12p70 剂量小于 15pg/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-12p70，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 |
|----------|----------|
| IL-12    | IL-12    |
| IL-23p40 |          |
| IL-12p35 |          |
| IL-23    |          |

## 参考文献

1. Gillessen, S. et al. (1995) Eur. J. Immunol. 25:200.
2. Ling, P. et al. (1995) J. Immunol. 154:116.
3. Wolf, S.F. et al. (1994) Stem Cells 12:154.
4. Sieburth, D. et al. (1992) Genomics 14:59.
5. Heinzl, F.P. et al. (1997) J.Immunol. 4381:4388
6. Hendrazak, J.A. and M.J. Brunda (1995) Laboratory Investigation 72:619.
7. Scharon-Kersten, T. et al. (1995) J.Immunol.5320:5330
8. Wolf, S.F. et al. (1994) stem cells 154:156