

## human 十项细胞因子检测试剂盒

(TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ /IL-1 $\beta$ /IL-2/IL-4/IL-6/IL-8/IL-10/IL-12p70/IL-17)

### 【产品货号】

BNCBA001

### 【产品名称】

十项细胞因子检测试剂盒 (流式荧光发光法)

### 【包装规格】

48/96 测试

### 【预期用途】

检测人体血清血浆和培养上清中 TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ /IL-1 $\beta$ /IL-2/IL-4/IL-6/IL-8/IL-10/IL-12p70/IL-17 的表达水平。

### 【检验原理】

本试剂盒采用 CBA 多因子流式检测技术, 微球荧光编码不同, 不同微球群上包被 TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ /IL-1 $\beta$ /IL-2/IL-4/IL-6/IL-8/IL-10/IL-12p70/IL-17 特异性抗体, 与待测样本孵育, 可与样本中 TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ /IL-1 $\beta$ /IL-2/IL-4/IL-6/IL-8/IL-10/IL-12p70/IL-17 特异性结合, 之后加入生物素标记的检测抗体, 形成抗体包被微球-细胞因子-检测抗体的免疫复合物; 最后加入藻红蛋白标记的链霉亲和素, 与生物素结合, 通过流式细胞仪检测, 获得待测物的荧光强度, 荧光强度与样本中 TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ /IL-1 $\beta$ /IL-2/IL-4/IL-6/IL-8/IL-10/IL-12p70/IL-17 的含量成正比, 最后结合这十种细胞因子标准品的标准曲线, 从而实现同一份样本中 TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ /IL-1 $\beta$ /IL-2/IL-4/IL-6/IL-8/IL-10/IL-12p70/IL-17 的定量检测。从而辅助判断机体的免疫功能状态。

### 【试剂盒组分】

序号	试剂盒组成	组分	48 测试	96 测试
A	捕获微球混合液	偶联人 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70、IL-17 各抗体的微球	2.5 mL	5 mL
B	检测抗体混合液	生物素化人 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70、IL-17 检测抗体	5 mL	10 mL
C	标准品	人 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70、IL-17 细胞因子重组蛋白冻干粉	1 套	2 套
D	藻红蛋白标记的链霉亲和素	SAV-PE	5 mL	10 mL
E	1 $\times$ 标准品/样品稀释液	-	16 mL/瓶 $\times$ 1 瓶	16 mL/瓶 $\times$ 2 瓶
F	20 $\times$ 洗液	-	25 mL/瓶 $\times$ 1 瓶	25 mL/瓶 $\times$ 1 瓶
G	微孔板	-	96 孔/块 $\times$ 1 块	96 孔/块 $\times$ 1 块
H	封板膜	-	4 张	4 张

注: 试剂盒中不包括, 但试验需要的材料: 流式管, 15 mL 离心管, 1.5 mL EP 管, 锡箔纸, 磁力板。

本产品仅用于科研

**【储存条件及有效期】**

2~8℃，避光保存，有效期 12 个月。开瓶后避光 2~8℃保存，可保存不超过 30 天。

**【适用机型】**

本品适用于市面上的大多数有 PE 和 APC 通道的流式细胞仪。

**【样本要求】**

血清、血浆、细胞培养上清：建议 4-6 小时内检测，如无法及时检测请-20℃冻存，忌反复冻融。

**【检验方法】****1 洗液缓冲液 (1×) 的准备**

颠倒混合标有 20×洗液的瓶子。在 475 mL 蒸馏水中加入 20×洗液 25 mL，并轻轻混合以免起泡沫。储存于 2~8℃待用。

**2 标准品制备 (准备 8 个 1.5 mL EP 管分别编号 1.2.3.4.5.6.7.8)**

2.1 使用前按照下表将各因子的标准品用标准稀释液溶解，充分混匀，室温放置10分钟，分别从每管中取出20μl 混合，此管将被用作标准品最高浓度1号管 (5000pg/ml)。

标准品	数量 (支)	含量/支	加入稀释液体积 (μl)	浓度 (pg/ml)
h TNF-α	1	1000pg	20	50000
h IFN-γ	1	1000pg	20	50000
h IL-2	1	1000pg	20	50000
h IL-4	1	1000pg	20	50000
h IL-6	1	1000pg	20	50000
h IL-10	1	1000pg	20	50000
h IL-12P70	1	1000pg	20	50000
h IL-1β	1	1000pg	20	50000
h IL-8	1	1000pg	20	50000
h IL-17	1	1000pg	20	50000

2.2 其他 7 个 (2~8 号) EP 管中分别加入 150 μL 标准品/样品稀释液，准备梯度稀释标准品。

2.3 在 1 号管中转移 50 μL 标准品到 2 号管充分混匀，再在 2 号管转移 50 μL 到 3 号管充分混匀。以同样方式依次连续稀释到 7 号管。

管号	上管标准品(μL)	标准品/样品稀释液 ( μL)	稀释比例 (对比 1 号)	浓度 pg/mL
1	——	——	——	5000
2	50	150	1 : 4	1250
3	50	150	1 : 16	312.5
4	50	150	1 : 64	78.13
5	50	150	1 : 256	19.53
6	50	150	1 : 1024	4.88
7	50	150	1 : 4096	1.22
8	——	150	——	0

### 3 样本处理

建议对于血清或血浆样本需使用标准品/样品稀释液进行 2 倍稀释。

表 1

样本	稀释比例 1:1	稀释倍数
血清或血浆样本	25 μL 样本+25 μL 标准品/样品稀释液	2

### 4 操作步骤

\*实验前将所有试剂取出平衡至室温；

\*96孔板需要卡进磁力板并和磁力板贴合好；

\*孵育过程中，板子应注意避光。

**4.1** 从梯度稀释好的标准品 1-8 号管中分别取出 50 μL 移入对应的 96 孔板孔中。

**4.2** 其余样本孔每孔加入稀释好的血清或血浆样本 50 μL。

**4.3** 涡旋微球 30 s，每孔加入 50 μL 微球，现每孔体积应为 100 μL/孔。（加微球过程中应随时涡旋微球管，避免微球沉降，建议每加1-8个孔，涡旋混匀一次微球）。

**4.4** 将 96 孔板放到摇床上 450 rpm/min 混匀2min。

**4.5** 将 96 孔板卡在37°C温箱30min。

**4.6** 将 96 孔板放在磁力板上吸附 5 min，去除上清。（**注意** 去除上清时，需要先甩去孔中的上清，然后在吸水纸上倒扣，直至吸水纸无水渍为止。**请勿用移液器。**）。

**4.7** 将 96 孔板从磁力板上取下，每孔加入 200 μL 洗液。

**4.8** 再将 96 孔板放在磁力板上 5 min，去除上清。

**4.9** 将 96 孔板从磁力板上取下，每孔加入 100 μL 检测抗体。

**4.10** 37°C温箱孵育30min。

**4.11** 重复步骤 4.6-4.8。

**4.12** 将 96 孔板从磁力板上取下，每孔加入 100 μL 藻红蛋白标记的链霉亲和素。

**4.13** 37°C温箱孵育15min。

**4.14** 重复步骤4.6-4.8。

**4.15** 每孔加入 200 μL 洗液重悬样本，上流式细胞仪检测。（**请注意** 建议实验前先调节好电压找到微球，保证微球群的个数与说明书一致，上机前也需要调节电压，保证微球群在PE通道的检测范围内。）

本产品仅用于科研

## 5 流式细胞仪检测

### 5.1 微球群分布：

表 2

特异性	微球位置	微球所属区域
h TNF- $\alpha$	L1	R1
h IFN- $\gamma$	L2	R1
h IL-2	L3	R1
h IL-4	L4	R1
h IL-6	L5	R1
h IL-10	L6	R2
h IL-12P70	L7	R2
h IL-1 $\beta$	L8	R2
h IL-8	L9	R2
h IL-17	L10	R2

注：微球内部用不同强度的荧光染料染色。

### 5.2 模板建立：

建立 X 轴为 FSC、Y 轴为 SSC 的线性散点图模板，设定混合微球位置，如下图 1；

建议两个 PE (X 轴) 和 APC 的对数散点图模板，分别显示 R1 门或 R2 门内微球，使得所有的微球群能够清楚和明显的分布于散点图上，显示各因子 PE 荧光强度。如图 2，图 3。

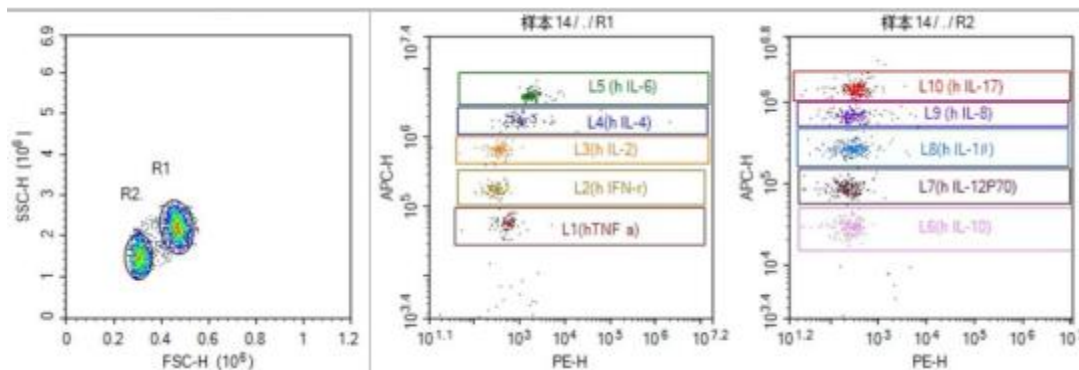


图 1

图 2

图 3

调节 PE PMT 电压，使所有微球群左侧不压线，右侧位于 PE 轴检测范围内（图 2,3）。

### 5.3 样品的检测结果分析

各标准品及样本依次上机检测，对于每种微球群，应最少获取 100 个微球。利用标准品梯度作标曲，计算样本检测结果。

## 6 软件分析

用 FCAP 软件进行分析

### 【参考区间】

用十项细胞因子检测试剂盒(流式荧光发光法)检测 150 例健康者，得到正常参考值：IL-1 $\beta$ ≤3.4 pg/mL、IL-2≤11.4 pg/mL、IL-4≤12.9 pg/mL、IL-6≤20.1 pg/mL、IL-8≤15.71 pg/mL、IL-10≤5.9 pg/mL、IFN- $\gamma$ ≤15.

1 pg/mL、TNF- $\alpha$   $\leq$  6.1 pg/mL、IL-12p70  $\leq$  10.18 pg/mL、IL-17  $\leq$  8.57 pg/mL (由于环境、性别、年龄等差异, 此数据仅 供参考)。

#### 【检测结果的解释】

1. 待检测样本细胞因子的测定在表 3 检测范围内, 测定结果有效, 可直接报告测定结果; 若检测结果超出检测范围, 应用标准品/样品/微球稀释液将样本稀释适当的倍数重新检测; 若待测样本的检测结果低于检测下限或未检测到, 则直接 报告为 $\leq$ 最低检测值。

表 3

特异性	检测范围
h TNF- $\alpha$	2.44pg/mL-5000pg/mL
h IFN- $\gamma$	19.53pg/mL-5000pg/mL
h IL-2	2.44pg/mL-5000pg/mL
h IL-4	1.22pg/mL-5000pg/mL
h IL-6	19.53pg/mL-5000pg/mL
h IL-10	1.22pg/mL-5000pg/mL
h IL-12P70	4.88pg/mL-5000pg/mL
h IL-1 $\beta$	9.77pg/mL-5000pg/mL
h IL-8	2.44pg/mL-5000pg/mL
h IL-17	4.88pg/mL-5000pg/mL

2. 建议: 负责数据揭示和出具报告的实验人员需经过正规的技术培训。

#### 【检验方法的局限性】

不合理的样本采集、转运、储存、处理以及仪器的设置不当均有可能导致错误的检测结果。

#### 【产品性能指标】

1. 外观和性状

试剂盒各组份应齐全、完整, 液体无渗漏; 外包装应完整、无破损, 标签应清晰、易识别。

2. 装量

应符合要求, 不低于标示值。

3. 准确度

使用本试剂盒检测已知浓度的样本, 其检测结果相对偏差在 $\pm$ 15%以内。

4. 重复性

本试剂盒检测 TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ /IL-1 $\beta$ /IL-2/IL-4/IL-6/IL-8/IL-10/IL-12p70/IL-17 变异系数 (CV) 应 $\leq$ 15%。

#### 【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于科研, 不用于临床诊断。

2. 实验样本、质控/标准品、实验废弃物等材料应当作为潜在传染物进行处理, 并且采用符合法规的预防措施对其处理。

3. 流式细胞仪未经正确校准、荧光渗漏未进行合理补偿以及检测区域 (设门) 未精确定位, 则可能产生错误的检测结果。请参考该仪器操作规程进行校准, 确保仪器在使用前处于最佳检测状态。

4. 本品含荧光素, 切勿直接接触皮肤或污染食物, 操作时务必戴手套操作。

本产品仅用于科研

5. 标准品在配成溶液后，请在10小时内使用。
6. 在使用之前，捕获微球混合液必须充分的振动混合。
7. 为确保荧光检测质量，凡涉及检测抗体的相关步骤都需避光操作。
8. 不同批号的试剂请勿混用，并请在有效期范围内使用。