

小鼠五项细胞因子检测试剂盒（流式荧光发光法）说明书

【产品名称】

小鼠五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】

检测小鼠生物标本中 TNF- α /IFN-r/IL-6/IL-10/IL-12 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 mouse TNF- α /IFN-r/IL-6/IL-10/IL-12 特异性抗体，与待测样本孵育，可与样本中 mouse TNF- α /IFN-r/IL-6/IL-10/IL-12 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 mouse TNF- α /IFN-r/IL-6/IL-10/IL-12 的含量成正比，最后结合这五种细胞因子标准品的标准曲线，从而实现对同一份样本中 mouse TNF- α /IFN-r/IL-6/IL-10/IL-12 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】

表 1 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 mouse TNF- α /IFN-r/IL-6/IL-10/IL-12 各抗体的微球	2.5 mL	5 mL
B	检测抗体混合液	生物素化 mouse TNF- α /IFN-r/IL-6/IL-10/IL-12 检测抗体	5 mL	10 mL
C	标准品	mouse TNF- α /IFN-r/IL-6/IL-10/IL-12 细胞因子重组蛋白冻干粉	各 1 支	各 2 支
D	藻红蛋白标记的链霉亲和素	SAV-PE	5 mL	10 mL
E	空白微球	微球	0.3ml	0.3ml
F	标准品/样品稀释液	-	16 mL/瓶×1 瓶	16 mL/瓶×2 瓶
G	20×洗液	-	25 mL/瓶×1 瓶	25 mL/瓶×1 瓶
H	微孔板	-	96 孔/块×1 块	96 孔/块×1 块
I	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

TEL: 010-82422342 www.biorigin.Ltd

【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 BD 公司的 BD FACSCanto II、Beckman Navios 6/2 和艾森公司的 ACEA NovoCyte 等有 PE、APC 通道的流式细胞仪。

【样本要求】

血清：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。

【实验前准备】

*实验前将所有试剂取出平衡至室温；

*确认 96 微孔板与磁力板匹配：96 孔板可以卡进磁力板，不易掉落，且微孔板与磁力板上下孔对应。

*孵育过程中，板子应注意避光。

*建议实验前先上机空白微球 50ul，调节好电压找到各群微球，保证微球群的群数与本说明书图中一致（可参考 5.2 圈门），然后再进行实验。

【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。

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 取每种因子的标准品各一支，瞬时离心，每管加入 40μL 标准品/样品稀释液，再次瞬时离心，室温放置 10 分钟，然后将各管的溶解后的标准品溶液混合为一管并混匀，此管将被用作标准品最高浓度 1 号管（STD-1 中各指标的浓度为 5000pg/ml）。

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 从 1 号管中转移 50 μL 标准品溶液到 2 号管中，混匀（STD-2）。再从 2 号管转移 50 μL 到 3 号管充分混匀（STD-3）。以同样方式依次连续稀释到 7 号管(STD-7)。

表 2 标准品的稀释

管号	标准品	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	STD-1	——	——	——	5000
2	STD-2	50	150	1 : 4	1250
3	STD-3	50	150	1 : 16	312.5
4	STD-4	50	150	1 : 64	78.13
5	STD-5	50	150	1 : 256	19.53
6	STD-6	50	150	1 : 1024	4.88
7	STD-7	50	150	1 : 4096	1.22
8	STD-8	——	150	——	0

3 样本处理

对因子浓度高的样本可以利用标准品/样品稀释液进行一定比例的稀释。（建议血浆或者血清类样本可适当提高稀释比例以降低基质效应）

4 操作步骤

4.1 加标准品和样品：从梯度稀释好的标准品 1-8 号管中分别取出 50 μ L 移入对应的 96 孔板孔中（注意 8 号管为标准品/样品稀释液）。其余样本孔每孔加入稀释好的血清或血浆样本 50 μ L。

4.2 加微球：混匀微球，每孔加入 50 μ L 微球，现每孔体积共为 100 μ L/孔。（加微球过程中需经常混匀微球，避免微球沉降，建议每加 4 个孔，混匀一次微球）。然后将 96 孔板放到摇床上 450 rpm/min，混匀 2 min。

4.3 孵育：将 96 孔板放在 37°C 温箱，30 min。

4.4 清洗：

4.4.1 将 96 孔板卡进磁力板中，静置吸附 5 min，翻转磁力板和 96 孔板，轻甩掉上清，然后倒扣于纸上，吸去多余的水分。

4.4.2 将 96 孔板从磁力板上取下，每孔加入 200 μ L 洗液，再将 96 孔板卡进磁力板中，静置吸附 5 min，翻转磁力板和 96 孔板，轻甩掉上清，然后倒扣于纸上，吸去多余的水分。

4.5 加检测抗体：将 96 孔板从磁力板上取下，每孔加入 100 μ L 检测抗体，将其放到摇床上 450 rpm/min，混匀 2 min。

4.6 孵育：37°C 温箱孵育 30 min。

4.7 清洗：同步骤 4.4

4.8 加 SAV-PE：将 96 孔板从磁力板上取下，每孔加入 100 μ L 藻红蛋白标记的链霉亲和素。将其放到摇床上 450 rpm/min 混匀 2 min。

4.9 孵育：37°C 温箱孵育 15 min。

4.10 清洗：同步骤 4.4

4.11 样本的重悬：每孔加入 100~200 μ L 洗液重悬样本（客户可根据机型和实验需求加入适量的洗液），上流式细胞仪检测。

备注：建议实验前利用空白微球调节电压找到微球，保证微球群的团数与说明书一致。

5 流式细胞仪检测

5.1 微球群分布：

表 3 微球群分布

特异性	微球所属区域
m IL-12P70	R1
m IL-6	R2
m IL-10	R2
m IFN-r	R2
m TNF-a	R2

5.2 模板建立：

(1)建立 X 轴为 FSC-H, Y 轴为 FSC-A 的密度图模板，设定门，不包含碎片和黏连的微球，如下图 1，P1

- (2)建立 X 轴为 FSC-H、Y 轴为 SSC-H 的线性密度图模板，设定混合微球位置 R1，R2，如下图 2；
- (3)建立 PE (X 轴) 和 APC(Y 轴)的对数密度图模板，分别显示 R1 门,R2 门内微球，使得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 3，图 4。

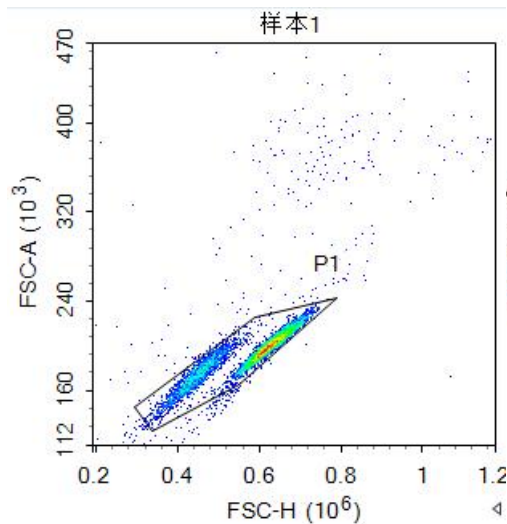


图1

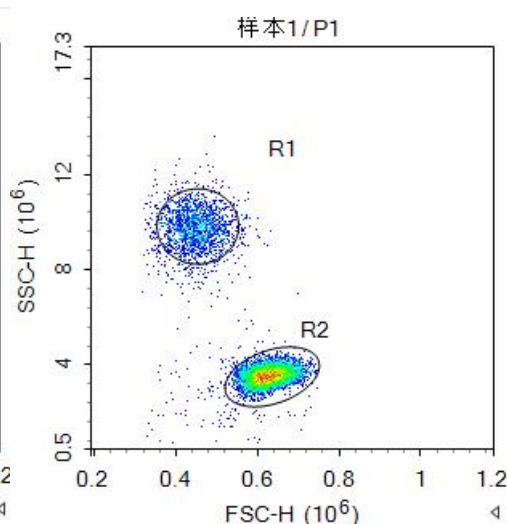


图2

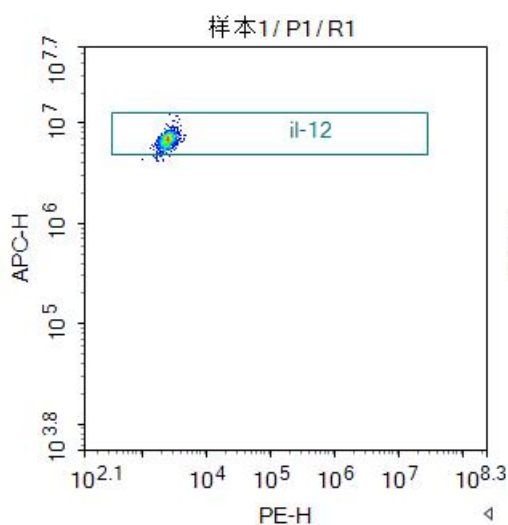


图3

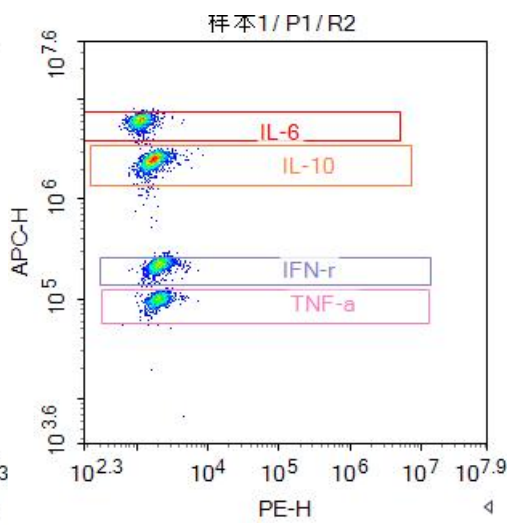


图4

调节PE PMT电压，使所有微球群右侧不压线，左侧位于PE轴检测范围内（图3，4）。

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。

【检测结果的解释】

- 待检测样本细胞因子的测定在表 4 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显示低于检测下限或未检测到，则直接

报告为≤最低检测值。

表 4 各指标检测范围

特异性	检测范围
m IL-12P70	4.88pg/mL-5000pg/mL
m TNF- α	4.88pg/mL-5000pg/mL
m IFN-r	19.53pg/mL-5000pg/mL
m IL-10	9.77pg/mL-5000pg/mL
m IL-6	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- α /IFN-r/IL-6/IL-10/IL-12 变异系数 (CV) 应 $\leq 15\%$ 。

【注意事项】

1. 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。
2. 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。
3. 本品含荧光素，切勿直接接触皮肤或沾染食物，操作时务必戴手套操作。
4. 标准品在配成溶液后，请在10小时内使用。
5. 在使用之前，捕获微球混合液必须充分的振动混合。
6. 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。
7. 不同批号的试剂请勿混用，并请在有效期范围内使用。