



小鼠六项细胞因子检测试剂盒（流式荧光发光法）说明书

【产品名称】

小鼠六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- γ /IL-6/IL-10/IL-12/MCP-1 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- γ /IL-6/IL-10/IL-12/MCP-1 特异性抗体，与待测样本孵育，可与样本中 mouse TNF- α /IFN- γ /IL-6/IL-10/IL-12/MCP-1 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- γ 、IL-6、IL-10、IL-12、MCP-1 的含量成正比，最后结合这六种细胞因子标准品的标准曲线，从而实现同一份样本中 mouse TNF- α /IFN- γ /IL-6/IL-10/IL-12/MCP-1 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 mouse TNF- α 、IFN- γ 、IL-6、IL-10、IL-12、MCP-1 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- γ 、IL-6、IL-10、IL-12、MCP-1 检测抗体 | 5 mL | 10 mL |
| C | 标准品 | mouse TNF- α 、IFN- γ 、IL-6、IL-10、IL-12、MCP-1 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 | 标准品/样品稀释液 | - | 16 mL/瓶×1 瓶 | 16 mL/瓶×2 瓶 |
| F | 20×洗液 | - | 25 mL/瓶×1 瓶 | 25 mL/瓶×1 瓶 |
| G | 微孔板 | - | 96 孔/块×1 块 | 96 孔/块×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。

【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。

【检验方法】

1 洗液 (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 7 个 1.5 mL EP 管分别编号 2.3.4.5.6.7.8)

2.2 取出标准品冻干粉，每个因子用 20 μL 标准品/样品稀释液溶解，充分混匀，室温放置 10 分钟，将溶解后的六个因子转移至 1 号管，并补 80ul 标准品/样品稀释液，作为标准品最高浓度 5000 pg/mL。

2.3 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。

2.4 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 捕获微球混合液处理

确定实验孔数 (包括标准品和样本)，计算所需捕获微球混合液的用量。例如：待测样本 88 个，标准品 8 个，共计 96 孔。每个孔需要捕获微球混合液 50 μL。我们可以按 100 孔的量进行微球混合，需取 5000 μL 捕获微球混合液。(注意：需将捕获微球涡旋 20 s，充分混匀后再取)

4 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。

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

5 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好；

*孵育过程中，板子应注意避光。

- ① 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。
- ② 其余样本孔每孔加入稀释好的血清或血浆样本 50 μ L。
- ③ 涡旋微球 30 s，每孔加入 50 μ L 微球，现每孔体积应为 100 μ L/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 将 96 孔板放到摇床上 450 rpm/min 摇 2min 后，放入 37°C 温箱，避光孵育 30min。
- ⑤ 将 96 孔板卡在磁力板上 5 min，去除上清。（**注意** 去除上清时，需要先用去孔中的上清，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。**）
- ⑥ 将 96 孔板从磁力板上取下，每孔加入 200 μ L 洗液。
- ⑦ 重复步骤 5.5。
- ⑧ 将 96 孔板从磁力板上取下，每孔加入 100 μ L 检测抗体。
- ⑨ 将 96 孔板放到摇床上 450 rpm/min 摇 2min 后，放入 37°C 温箱，避光孵育 30min。
- ⑩ 5.10 重复步骤 5.5-5.7。
- ⑪ 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。
- ⑫ 将 96 孔板放到摇床上 450 rpm/min 摇 2min 后，放入 37°C 温箱，避光孵育 15min。
- ⑬ 5.13 重复步骤 5.5-5.7。
- ⑭ 5.14 每孔加入 200 μ L 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。）

6 流式细胞仪检测

6.1 微球群分布：

表 2

| 特异性 | 微球位置 | 微球所属区域 |
|-----------------|------|--------|
| m IL-12P70 | L1 | R1 |
| m TNF- α | L2 | R2 |
| m IFN- γ | L3 | R2 |
| m MCP-1 | L4 | R2 |
| m IL-10 | L5 | R2 |
| m IL-6 | L6 | R2 |

注：微球内部用不同强度的荧光染料染色。

6.2 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。

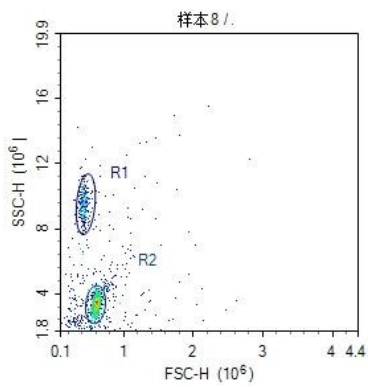


图 1

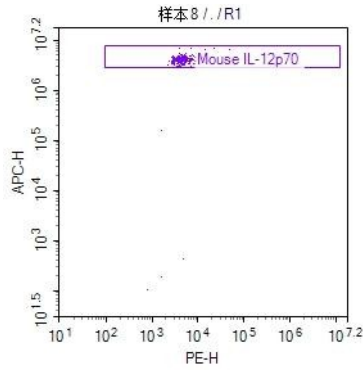


图 2

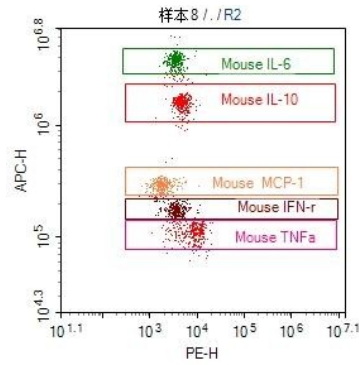


图 3

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

⊗ 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 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 3

| 特异性 | 检测范围 |
|------------|----------------------|
| m IL-12P70 | 1.22pg/mL-5000pg/mL |
| m TNF-α | 1.22pg/mL-5000pg/mL |
| m IFN-γ | 19.53pg/mL-5000pg/mL |
| m MCP-1 | 4.88pg/mL-5000pg/mL |
| m IL-10 | 1.22pg/mL-5000pg/mL |
| m IL-6 | 1.22pg/mL-5000pg/mL |

5 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】

- 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。

- 装量

应符合要求, 不低于标示值。

- 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±15%以内。

4 重复性

本试剂盒检测 TNF- α /IFN- γ /IL-6/IL-10/IL-12/MCP-1 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。

