

十项细胞因子检测试剂盒（流式荧光发光法）说明书

【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- α /IFN- γ /IL-1 β /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- α /IFN- γ /IL-1 β /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- α /IFN- γ /IL-1 β /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- α /IFN- γ /IL-1 β /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，从而实现对同一份样本中 TNF- α /IFN- γ /IL-1 β /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- α 、IFN- γ 、IL-1 β 、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- α 、IFN- γ 、IL-1 β 、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- α 、IFN- γ 、IL-1 β 、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。

【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 20 μL 混合，此管将被用作标准品最高浓度 1 号管 (5000 pg/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

备注：上表中的 50000 pg/ml 为各因子溶解后在其对应管的浓度，当按要求配制成混合标准品后，即 1 号管标准品各因子的浓度为 5000 pg/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 标准品到 2 号管中，充分混匀，再从 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；

*实验过程中，包括清洗步骤，将板子始终水平放置，以免珠子丢失；

*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，建议每加两个孔，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 孔板放在 37°C 温箱孵育 30min。
- 4.6 将 96 孔板放在磁力板上吸附 5 min，去除上清。
- 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 μ L 洗液重悬样本，上流式细胞仪检测。

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- α	L1	R1
h IFN- γ	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 β	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。

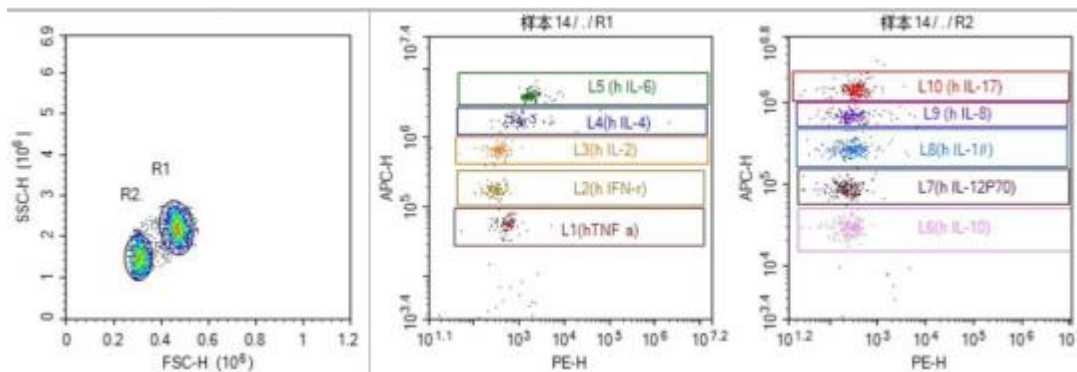


图 1

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 β ≤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- γ ≤15.1 pg/mL、TNF- α ≤6.1 pg/mL、IL-12p70≤10.18 pg/mL、IL-17≤ 8.57pg/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≤最低检测值。

表 3

特异性	检测范围
h TNF- α	2.44pg/mL-5000pg/mL
h IFN- γ	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 β	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±15%以内。

4. 重复性

本试剂盒检测 TNF- α /IFN- γ /IL-1 β /IL-2/IL-4/IL-6/IL-8/IL-10/IL-12p70/IL-17 变异系数 (CV) 应≤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沾染食物，操作时务必戴手套操作。

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，并在有效期范围内使用。