

ABplex Human Cytokine 12-Plex Assay Kit

Catalog NO.RK04296

用于同时检测人细胞培养上清、血清或血浆中
多种生物标志物的含量

在使用本产品前，必须完整阅读本包装说明书
仅供研究使用，不适用于临床诊断

预期用途

本试剂盒用于检测人体生物标本或细胞培养上清中 IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70、IL-17A、IFN- α 、IFN- γ 、TNF- α 的表达。

检测原理

利用流式荧光原理定量检测样本中 IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70、IL-17A、IFN- α 、IFN- γ 、TNF- α 的含量。第一步，将样本和结合捕获抗体的微球混悬液混合，样本中的分析物与微球上特异性捕获抗体结合；第二步，添加检测抗体，检测抗体与第一步的反应产物特异性结合；第三步，添加荧光素溶液，荧光素上链霉亲和素与检测抗体上的生物素结合，最终形成“微球表面的捕获抗体-抗原-生物素化抗体-链霉亲和素荧光素”复合物。采用流式仪对其进行检测时，不同微球复合物可被识别出具体的分析物类型并分析对应的浓度，实现样本中 IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70、IL-17A、IFN- α 、IFN- γ 、TNF- α 的定量检测。

试剂盒组分及保存条件

2 ~ 8℃避光保存，避免冷冻。未开封前，除非特殊说明，试剂盒中所有成分自生产日起可稳定 12 个月。校准品复溶后 24 小时内使用。

组成	主要成分	规格与装量		
		50T/盒	100T/盒	200T/盒
微球混悬液	结合有 IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70、IL-17A、IFN- α 、IFN- γ 、TNF- α 抗体的荧光微球	0.25mL/支 $\times$ 1 支	0.5mL/支 $\times$ 1 支	1mL/支 $\times$ 1 支
检测抗体溶液	生物素标记的 IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70、IL-17A、IFN- α 、IFN- γ 、TNF- α 抗体	2.5mL/瓶 $\times$ 1 瓶	5mL/瓶 $\times$ 1 瓶	10mL/瓶 $\times$ 1 瓶
荧光素溶液	链霉亲和素藻红蛋白	2.5mL/瓶 $\times$ 1 瓶	5mL/瓶 $\times$ 1 瓶	10mL/瓶 $\times$ 1 瓶
样本稀释液	含 BSA 的稀释液	20mL/瓶 $\times$ 1 瓶	20mL/瓶 $\times$ 1 瓶	20mL/瓶 $\times$ 1 瓶
20 $\times$ 浓缩洗液	20 倍浓缩 PBST 缓冲液	20mL/瓶 $\times$ 1 瓶	20mL/瓶 $\times$ 1 瓶	20mL/瓶 $\times$ 1 瓶
校准品	BSA、PBS 缓冲液等稀释的 IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70、IL-17A、IFN- α 、IFN- γ 、TNF- α 抗原冻干品	1 瓶	2 瓶	4 瓶

实验所需的材料

1. 可调式微量移液器和吸头

2. 恒温孵育器

3. 磁力板

重要提示

1. 请留意产品标签上的有效期时间，并在有效期前使用本产品。
2. 请勿将不同批次或者来自不同厂家的试剂混合使用。
3. 如测试获得的样本浓度值超过了产品的最高检测限，请使用产品中的样本稀释液对样本进行稀释。
4. 实验过程中的加样、洗板、孵育时间、孵育温度等操作均会对最终结果造成影响，请严格管理实验流程并做好记录。
5. 样本的收集、处理及保存均会对检测结果产生影响，请务必严格管理样本的处理过程。
6. 在本试验中对所有因素进行试验之前，不能排除干扰的可能性。
7. 相关试剂中可能存在有害物质，使用中请注意佩戴手套，必要时佩戴护目镜。
8. 为保证最佳检测效果，相关试剂组分的保存方式请参照标签或说明书。
9. 试剂配制后的混匀对检测结果非常重要，但部分蛋白或抗体对剧烈的涡旋非常敏感，可能造成活性损失，请谨慎使用高速涡旋。
10. 请使用灭菌的耗材进行试剂配制，以免造成试剂污染，影响最终检测结果。
11. 为保证最佳检测效果，溶解后的标准蛋白及相关试剂的工作液不

建议冻存后重复使用。

12. 产品在储存或使用中，请注意避光。
13. 为保证最佳检测效果，添加不同样本时，请注意更换吸头。
14. 请严格按照说明书的要求进行试剂配制。如果您将分次使用试剂盒，请使用反应板，并且在开封后的 1 个月内使用完。

样本收集与保存

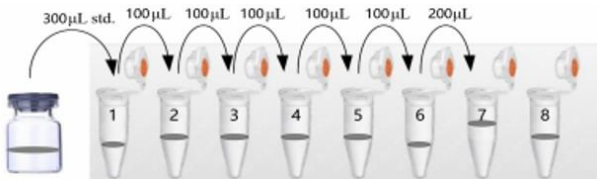
1. 细胞培养上清：1000×g 离心 10 分钟后及时检测；或将样本置于 -20 至 -80℃ 中分装保存（24 小时内检测可置于 2-8℃），避免反复冻融。如果细胞培养上清样本的稀释度比较大，可先用培养基进行预稀释，最后用样本稀释液稀释。
2. 血清：使用血清分离管，分离血清前让样品凝结 30 分钟，1000 ×g 离心 10 分钟取上清并及时检测；或将样本置于 -20℃ 至 -80℃ 中分装保存（24 小时内检测可置于 2-8℃），避免反复冻融。
3. 血浆：收集血浆时用 EDTA 或肝素作为抗凝剂，在 30 分钟内 1000 ×g 离心 15 分钟后及时检测；或将样本置于 -20℃ 至 -80℃ 中分装保存（24 小时内检测可置于 2-8℃），避免反复冻融。
4. 血清或血浆样本需在 4h 内按临床血液样本采集要求处理并检测，若无法在 4h 内检测，可 2-8℃ 下保存，注意不超过 24h，若超过 24h 检测。将样本置于 -20℃ 下可保存 3 个月，或 -80 下可冻存 6 个月，样本不宜反复冻融，不同时间检测同一样本，样

本储存条件必须一致，检测前样本必须恢复至室温。样本用保温箱加冰袋密封冷藏运输。

试剂准备

1. 使用前将所需使用的试剂平衡至室温。

标准品：准备 8 支 EP 管并标记为 1-8 号，按照顺序排列，用于稀释校准品，向管 1 中加入 300 μ L 复溶校准品，向管 2-6 中各加 300 μ L 样本稀释液，管 7 中加入 200 μ L 样本稀释液，从管 1 中取 100 μ L 转移到管 2 中，用移液枪吹打 10 次充分混匀，从管 2 中取 100 μ L 转移到管 3 中，再转移到管 4 中，继续连续稀释至管 6，从管 6 中取 200 μ L 转移到管 7 中稀释，并充分混匀。管 8 中加入 300 μ L 样本稀释液作为零值校准品。



2. 洗涤液 (20x)：在使用前用双蒸水或去离子水以 1:20 的比例稀释。

样本准备

不同的样本需要根据具体情况选择合适的稀释倍数，稀释样本请使用试剂盒内的样本稀释液。

1. 细胞上清：由于细胞上清样本因实验条件不同，呈现较大的差异，故细胞上清样本建议进行预测试来决定合适的稀释倍数，样本稀释请使用样本稀释液
2. 血清/血浆：建议进行预测试来决定合适的稀释倍数，样本稀释请使用样本稀释液

实验步骤

为获得理想的实验结果，在用完每一种试剂组份后将剩下的组份立即放入 2-8℃，防止长菌。

- 1.准备好试剂盒，将待检样本按要求处理，将 20×浓缩洗液按照使用需要量用去离子纯化水稀释 20 倍备用。
- 2.分别在反应板上依次加入：各梯度校准品 50μL/孔或稀释后的样本 50μL/孔（样本稀释液 25μL/孔+样本 25μL/孔），加入微球混悬液（取前充分混匀）5μL/孔，贴上封板膜，充分混匀，置于恒温孵育器上 1200rpm, 37℃避光温育 60min。取出反应板，置于磁力板上，磁吸 2min，撕开封板膜，保持反应板贴合磁力板，倾去上清，并用吸水纸吸去残留液体。
- 3.按照 100 μL/孔加入洗液，置于恒温孵育器上 1200rpm，震荡 1-3min，置于磁力板上磁吸 2min，倾去上清，并用吸水纸吸去残留液体。
- 4.在反应板孔内，按照 50μL /孔加入检测抗体溶液，贴上封板膜，置于恒温孵育器上 1200rpm，37℃避光温育 30min。取出反应板，置于磁力板上，磁吸 2min，倾去上清，并用吸水纸吸去残留液体。

5.重复步骤 3 一次。

6.在反应板孔内，按照 50 μ L /孔加入荧光素溶液，贴上封板膜，置于恒温孵育器上 1200rpm，37 $^{\circ}$ C避光温育 15min。取出反应板，置于磁力板上，磁吸 2min，倾去上清，并用吸水纸吸去残留液体。

7.重复步骤 3 一次。

8.将反应板从磁力板上取下，加入 70 μ L /孔洗液，充分混匀后选择适当容器上机检测。

简要实验流程

准备好需要测试的样本和试剂



每孔加入 50 μ L 标准品或待测样本（样本稀释液 25 μ L/孔+样本 25 μ L/孔）



每孔加入 5 μ L 微球混悬液

37 $^{\circ}$ C孵育 1 小时，然后洗涤 1 次



添加 50 μ L 检测抗体溶液

37 $^{\circ}$ C孵育 0.5 小时，洗 1 次



添加 50 μ L 荧光素溶液

37 $^{\circ}$ C避光孵育 15 分钟，洗涤 1 次



添加 70 μ L 洗涤缓冲液



使用 ABplex-100 仪器检测

结果计算

1. 使用测试获得的浓度值绘制标准曲线，推荐使用四参数拟合，具体也可根据需求选择其他拟合方式来绘制标准曲线。
2. 使用计算机软件以标准品荧光值为纵坐标（Y），标准品浓度为横坐标（X），绘制标准曲线。根据标准曲线和稀释样本的荧光值分别计算稀释样本中分析物的浓度。
3. 如果样本在上样检测时进行了稀释，那么计算获得浓度需要乘以相应的稀释倍数。

【检验结果解释】

本产品通过对 IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70、IL-17A、IFN- α 、IFN- γ 、TNF- α 校准品的测值进行标准曲线拟合。计算 IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70、IL-17A、IFN- α 、IFN- γ 、TNF- α 的浓度。若检测结果大于校准品信息检测上限，建议用样本稀释液将样本适当稀释后重新检测，若检测结果小于最低检测限，建议报告小于最低检测限，本检测结果反映当时样

本中分析物的浓度，需要结合症状进行诊断。

【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检测结果不准确。

【产品性能指标】

检出限

IL-1 β 的检出限不高于3.5pg/mL、IL-2的检出限不高于2.5pg/mL、IL-4的检出限不高于2.5pg/mL、IL-5的检出限不高于2.5pg/mL、IL-6的检出限不高于2.5pg/mL、IL-8的检出限不高于5pg/mL、IL-10的检出限不高于3.5pg/mL、IL-12p70的检出限不高于2.5pg/mL、IL-17A的检出限不高于5pg/mL、IFN- α 的检出限不高于3.5pg/mL、IFN- γ 的检出限不高于3.5pg/mL、TNF- α 的检出限不高于2.5pg/mL

准确度

将已知浓度的 IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70、IL-17A、IFN- α 、IFN- γ 、TNF- α 加入到血清基质中，其回收率在[85%，115%]。

线性

- a) IL-1 β 线性区间符合如下要求：线性区间不窄于[3.5, 5000]pg/mL；线性相关系数|r|应不小于0.980。
- b) IL-2线性区间符合如下要求：线性区间不窄于[2.5, 5000]pg/mL；线性相关系数|r|应不小于0.980。
- c) IL-4线性区间符合如下要求：线性区间不窄于[2.5, 5000]pg/mL；线性相关系数|r|应不小于0.980。
- d) IL-5线性区间符合如下要求：线性区间不窄于[2.5, 5000]pg/mL；线性相关系数|r|应不小于0.980。
- e) IL-6线性区间符合如下要求：线性区间不窄于[2.5, 5000]pg/mL；线性相关系数|r|应不小于0.980。
- f) IL-12p70线性区间符合如下要求：线性区间不窄于[2.5, 5000]pg/mL；线性相关系数|r|应不小于0.980。
- g) IL-10线性区间符合如下要求：线性区间不窄于[3.5, 5000]pg/mL；线性相关系数|r|应不小于0.980。
- h) IL-17A线性区间符合如下要求：线性区间不窄于[5, 5000]pg/mL；线性相关系数|r|应不小于0.980。
- i) IFN- α 线性区间符合如下要求：线性区间不窄于[3.5, 5000]pg/mL；线性相关系数|r|应不小于0.980。
- j) IFN- γ 线性区间符合如下要求：线性区间不窄于[3.5, 5000]pg/mL；线性相关系数|r|应不小于0.980。
- k) TNF- α 线性区间符合如下要求：线性区间不窄于[2.5, 5000]pg/mL；线性相关系数|r|应不小于0.980。
- L) IL-8线性区间符合如下要求：线性区间不窄于[5, 5000]pg/mL；线性相关系数|r|应不小于0.980。

重复性

变异系数(CV)应不大于 15%。

批间差

变异系数(CV)应不大于 15%。

干扰因素

检测结果不受黄疸（胆红素 < 25mg/dL），溶血（血红蛋白 < 28mg/dL），脂血（甘油三酯 < 1500mg/dL）的影响。交叉反应：本试剂盒与以下物质不发生交叉反应。

IL-7	10000pg/mL
IL-13	10000pg/mL
IL-15	10000pg/mL
IL-18	10000pg/mL
IL-22	10000pg/mL

高剂量钩状效应

高剂量钩状效应：IL-1 β 浓度达到 40000 pg/mL、IL-2 浓度达到 4000 0pg/mL、IL- 4 浓度达到 40000pg/mL、IL-5 浓度达到 20000pg/mL、IL- 6 浓度达到 40000pg/mL、IL-10 浓度达到 4000 0pg/mL、IL-12p70

浓度达到 40000 pg/mL、IL-17A 浓度达到 40000pg/mL、IFN- α 浓度达到 40000pg/mL、IFN- γ 浓度达到 40000pg/mL、IL-8 浓度达到 4000pg/mL 和 TNF- α 浓度达到 40000pg/mL 对检测不产生钩状效应。

【注意事项】

- (1) 本试剂仅用于体外检测。
- (2) 试剂盒使用前需检查各试剂的包装有无液体渗漏。
- (3) 使用者需要经过必要的培训，使用前必须仔细阅读说明书，并严格按照说明书要求进行操作。
- (4) 操作时须做好个人防护，预防样本、试剂、校准品等与人体接触。
- (5) 临床样本、校准品、实验废弃物等材料应当作为潜在的传染源进行处理，且必须符合相关法规要求。
- (6) 为确保测试结果准确可靠，请定期进行校准，试剂更换批次时需进行校准。
- (7) 开瓶用剩的试剂勿与新开瓶试剂混用，防止污染新开瓶试剂，污染后试剂请弃用。
- (8) 不同批号的试剂不得混用，请在有效期范围内使用。
- (9) 用吸水纸吸去残留液体，避免孔间污染。
- (10) 反应结束后，在 4 小时内完成样本上机测试，测试过程中，注意待测样本避光。

【参考文献】

- [1]中国医药教育协会感染疾病专业委员会. 感染相关生物标志物临床意义解读专家共识[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2017, 40(4): 243-257.
- [2]Gron, K. L. et al. Risk of serious infections in patients with rheumatoid arthritis treated in routine care with abatacept, rituximab and tocilizumab in Denmark and Sweden [J]. Annals of the Rheumatic Diseases 2019,78:320-327.
- [3]Bender L , Thaarup J , Varming K , et al. Early and late markers for the detection of early-onset neonatal sepsis[J]. Danish medical bulletin, 2008, 55(4):219-223.
- [4]黄媛, 张丽, 王斐,等. 血清白介素 1 β 、白介素 6、白介素 8、白介素 10 和肿瘤坏死因子 α 成人参考区间的初步建立[J]. 临床检验杂志, 2018(7):549-551.
- [5]Coperchini F , Chiovato L , Ricci G , et al. The Cytokine storm in COVID-19: Further advances in our understanding the role of specific chemokines involved[J]. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2021,58(3):82-91.
- [6]Liao J , Wen B , Deng X . Progress on role of cytokine storm in exacerbation of coronavirus disease 2019 (COVID-19): Review[J]. Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi = Chinese journal of cellular and molecular immunology, 2020, 36(10):941-947.

【基本信息】

生产企业名称: 武汉爱博泰克生物科技有限公司

生产地址: 武汉市东湖新技术开发区精准产业园 4-5 栋

联系电话: 027-87201009 邮编: 430075

【说明书核准及修改日期】

2024 年 10 月 30 日