

NHP Cytokine 7-Plex Assay Kit

(Flow Cytometry Multiplex Bead Assay)

Catalog No.RK05215

用于同时检测 Non-Human Primate 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 Non-Human Primate 生物标本或细胞培养上清中 IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17A、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-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17A、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-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17A、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	
		48T/盒	96T/盒
微球混悬液	结合有 IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17A、IFN- γ 、TNF- α 抗体的荧光微球	0.25mL/支 $\times$ 1 支	0.5mL/支 $\times$ 1 支
检测抗体溶液	生物素标记的 IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17A、IFN- γ 、TNF- α 抗体	2.5mL/瓶 $\times$ 1 瓶	5mL/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
样本稀释液	PBS 稀释液	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
校准品	PBS 缓冲液等稀释的 IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17A、IFN- γ 、TNF- α 抗原冻干品	1 瓶	2 瓶

实验所需的材料和工具

1. 单通道移液器、多通道移液器和吸头

2.磁力板

3.用于样品采集或稀释的聚丙烯微型离心管

4.去离子或蒸馏的超纯水

5.封板膜

6.反应板

7.恒温孵育器

8.配备有两个激光器的流式细胞仪：

- (1) 488nm 或 532nm 激发，575nm 发射；
- (2) 633nm 激发，670nm 发射；
- (3) 有相应的 PE 和 APC 以及 APC-Cy7 检测通道。

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 300μL 复溶校准品，向管 2-6 中各加 300μL 样本稀释液，管 7 中加入 200uL 样本稀释液，从管 1 中取 100μL 转移到管 2 中，用移液枪吹打 10 次充分混匀，从管 2 中取 100μL 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 200uL 转移到管 7

中稀释，并充分混匀。管 8 中加入 300uL 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 50 μ L/孔或稀释后的样本 50 μ L/孔（样本稀释液 25 μ L/孔+样本 25 μ L/孔），加入微球混悬液（取前充分混匀）5 μ L/孔，贴上封板膜，充分混匀，置于恒温孵育器上 1200rpm, 37°C 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 μ L/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 50 μ L /孔加入检测抗体溶液，贴上封板膜，置于恒温孵育器上 1200rpm，37°C 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°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°C 孵育 1 小时，然后洗涤 1 次



添加 50 μ L 检测抗体溶液

37°C 孵育 0.5 小时，洗 1 次



添加 50 μ L 荧光素溶液

37°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

流式参数调试及数据采集

1. 参数调试

样本上机前，可先取 5 μL 充分分散好的微球混悬液与 70 μL 洗涤缓冲液充分混匀后上机，通过 FSC 和 SSC 找到微球对应的位置并划门，以门内的微球为对象，通过 APC 通道和 APC-Cy7 通道的荧光强弱能明显找到 12 群微球，如仪器 PMT 电压可调，则调节 PE 通道 PMT 电压，使得所有微球群左侧不要压线

2. 数据收集

各标准品及样品依次上机检测，对于每种微球群，应获取 100-200 个微球，比如本试剂盒 12 个微球群，共计获取 1200-2400 个微球数据。。

3. 数据处理

本试剂盒所获得的数据可用 FCAP 软件自动分析。如果没有 FCAP 软件，也可以进行手动分析，手动分析过程如下：

(1) FSC 和 SSC 通道划门圈定总的微球；在圈定的门内，通过 APC 和 APC-Cy7 通道可见 12 群微球，对应 12 种细胞因子检测微球。

(2) 获取标准品或者样本各个微球群在 PE 通道下的平均荧光值。在 Excel 下输入标准品各个微球群在 PE 通道下的平均荧光值及对应的细胞因子浓度，将各样本的荧光值减去空白管的荧光值，将浓度与对应的扣除了空白管的荧光值均取对数。

【检验结果解释】

本产品通过对 IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17A、IFN- γ 、TNF- α 校准品的测值进行标准曲线拟合。计算 IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、

IL-17A、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-2 的检出限不高于2.5pg/mL、IL-4的检出限不高于2.5pg/mL、IL-6 的检出限不高于2.5pg/mL、IL-10的检出限不高于3.5mg/mL、IL-17A 的检出限不高于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-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17A、IFN- γ 、TNF- α 加入到血清基质中，其回收率在[85%，115%]。

线性

a) 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。

b) 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。

c) 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。

d) 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。

e) 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。

f) 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。

g) 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。

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-2 浓度达到 40000pg/mL、IL-4 浓度达 40000 pg/mL、IL-6 浓度达到 40000pg/mL、IL-10 浓度达到 40000pg/mL、IL-17A 浓度达到 40000pg/mL、IFN- γ 浓度达到 40000pg/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）操作时须做好安全防护，预防样本、试剂、校准品等与人类接触。
- （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，并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 成猴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】

2025 年 01 月 30 日