Human Cytokine 15-Plex Assay Kit (Flow Cytometry Multiplex Bead Assay)

Catalog NO.:RK05222

用于同时检测细胞培养上清、血清和血浆中的多种人体生物标志物

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

本试剂盒产品用于测定细胞培养上清、血清或血浆样品中 GM-CSF、CCL3/MIP-1α、CCL4/MIP-1β、IFN-γ、IL-1β、IL-2、IL-2RA/CD25、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12/IL-23 p40、IL-17A、TNF-α等多种人体生物标志物的含量。

检测原理

采用流式荧光原理定量测定人体生物标本中 GM-CSF、CCL3/MIP-1α、CCL4/MIP-1β、IFN-γ、IL-1β、IL-2、IL-2RA/CD25、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12/IL-23 p40、IL-17A、TNF-α的含量：首先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；其次添加检测抗体，检测抗体与第一步的反应产物特异性结合；然后添加荧光素溶液，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 GM-CSF、CCL3/MIP-1α、CCL4/MIP-1β、IFN-γ、IL-1β、IL-2、IL-2RA/CD25、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12/IL-23 p40、IL-17A、TNF-α的定量检测。

试剂盒组分及保存条件

未拆封的试剂盒可在 2-8℃保存 1 年，已拆封的产品须在 1 个月内使用完。

组份	主要成分	规格	货号	储存条件及有效期
微球混悬液	结合有 GM-CSF、CCL3/MIP-1α、CCL4/MIP-1β、IFN-γ、IL-1β、IL-2、IL-2RA/CD25、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12/IL-23 p40、IL-17A、TNF-α抗体的荧光微球。	500uL/支	RM59946	拆封前 2-8°C 保存 12 个月 拆封后 2-8℃ 保存 1 个月
浓缩生物素化抗体（100×）	生物素标记的 GM-CSF、CCL3/MIP-1α、CCL4/MIP-1β、IFN-γ、IL-1β、IL-2、IL-2RA/CD25、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12/IL-23 p40、IL-17A、TNF-α抗体。	50uL/支	RM59947	拆封前 2-8°C 保存 12 个月 拆封后 2-8℃ 保存 1 个月
浓缩 SA-PE（5×）	耦联链霉亲和素的 SA-PE	1000uL/支	RM59400	2-8℃ 保存 12 个月
标准品/样本稀释液（R1）	含 BSA 的稀释液	20mL/支	RM59401	2-8℃ 保存 12 个月
生物素化抗体稀释液	含 BSA 的稀释液	12mL/支	RM59402	2-8℃ 保存 12 个月

（R2）				
SA-PE 稀释液（R3）	含 BSA 的稀释液	12mL/支	RM59403	2-8°C 避光保存 12 个月
浓缩洗涤液（20X）	20 倍浓缩 PBS 缓冲液	30mL/支	RM59404	2-8°C 保存 12 个月
标准品	BSA、PBS 缓冲液等稀释的 GM-CSF、CCL3/MIP-1α、CCL4/MIP-1β、IFN-γ、IL-1β、IL-2、IL-2RA/CD25、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12/IL-23 p40、IL-17A、TNF-α抗原冻干品。	2 瓶	RM59945	2-8°C 保存，每次检测都使用新鲜的标准品。使用后丢弃，避免反复冻融。
封板膜	\	4 个	\	\
孵育板	\	1 块	\	\
说明书	\	1 份	\	\

实验所需的材料

1. 可调式微量移液器和吸头
2. 反应板封板膜
3. 恒温孵育器

4. 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。所以，在正式测试样本前，建议先进行预测试。
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，请使用封口袋密封好预包被板，并且在开封后的 1 个月内使用完。

样本收集与保存

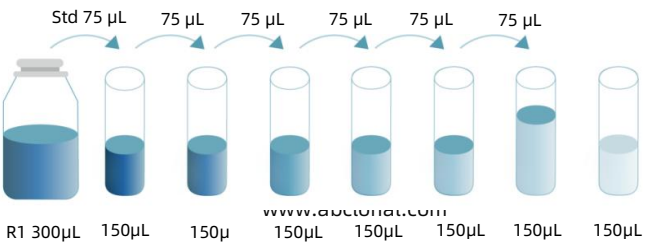
1. 细胞培养上清：1000×g 离心 10 分钟后及时检测；或将样本置于-20 至-80℃中分装保存（24 小时内检测可置于 2-8℃），避免反复冻融。如果细胞培养上清样本的稀释度比较大，可先用培养基进行预稀释，最后用标准品/样本稀释液(R1)稀释。
2. 血清：使用血清分离管，分离血清前让样品凝结 30 分钟，1000×g 离心 10 分钟取上清并及时检测；或将样本置于-20℃至-80℃中分装保存(24 小时内检测可置于 2-8℃），避免反复冻融。
3. 血浆：收集血浆时用 EDTA 或肝素作为抗凝剂，在 30

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. 其它生物体液：1000×g 离心 20 分钟后取上清检测，或将上清置于-20℃至-80℃分装保存，避免反复冻融。
5. 避免使用溶血、高血脂血清/血浆样本。

试剂准备

1. 使用前将所需使用的试剂平衡至室温。
2. 微球混悬液：在点样前将微球混悬液涡旋充分，然后每孔加入 5ul 的微球混悬液，注意每加 8 个孔需要将微球混悬液进行涡旋后再进行点样。
3. 标准品：向冻干品中加入 300ul 的标准品/样本稀释液 R1，轻轻混匀至少 15min，使冻干品完全溶解。按照下图准备好包含 R1 稀释液的 EP 管，并按照提示进行梯度稀释。



4. 浓缩生物素化抗体（100x）：在使用前用生物素化抗体稀释液（R2）将浓缩生物素化抗体以 1:99 的比例稀释，注意：稀释后的工作液应在 30 分钟内使用。
5. 浓缩 SA-PE（5x）：在使用前用 SA-PE 稀释液（R3）将浓缩 SA-PE 以 1:4 的比例稀释。注意：稀释后的工作液应在 30 分钟内使用。
6. 洗涤液（20x）：在使用前用双蒸水或去离子水以 1:19 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，样本稀释请使用标准品/样本稀释液（R1）或是 PBS；
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或是 PBS。

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. 将待测样本和浓缩洗涤液按要求进行预处理。
2. 加入微球混悬液（取前充分混匀）5ul/孔，然后加入各梯度标准品或处理后的样本 50ul/孔，贴上封板膜，置于恒温孵育器上 1200rpm，37℃避光温育 60min，使其充分混匀。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. 加入洗液 100ul/孔，置于恒温孵育器上 1200rpm，震荡 1min，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. 加入生物素化抗体 50ul/孔，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. 加入 SA-PE 50ul/孔，贴上封板膜，置于恒温孵育器上 1200rpm，37℃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 55ul/孔洗液，充分混匀后选择适当容器上机检测。（上机操作请参阅仪器使用说明书）

简要实验流程

准备好需要测试的样本和试剂

↓

每孔加入 5μL 编码微球

↓

每孔加入 50μL 标准品或待测样本

37℃孵育 1 小时，然后洗涤 1 次

↓

添加 50μL 工作检测抗体

37℃孵育 0.5 小时，洗 1 次

↓

添加 50μL SA-PE

37℃避光孵育 15 分钟

↓

添加 55μL 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。

灵敏度

分析物	灵敏度（LOB）	分析物	灵敏度（LOB）
GM-CSF	1.53pg/mL	IL-5	1.06pg/mL
CCL3/MIP-1α	0.10pg/mL	IL-6	1.28pg/mL
CCL4/MIP-1β	3.26pg/mL	IL-8	0.37pg/mL
IFN-γ	2.89pg/mL	IL-10	0.24pg/mL
IL-1β	0.37pg/mL	IL-12/IL-23 p40	6.39pg/mL
IL-2	2.13pg/mL	IL-17A	2.01pg/mL
IL-2RA/CD25	4.61pg/mL	TNF-α	0.58pg/mL
IL-4	1.69pg/mL		

蛋白标准浓度

分析物	球号	标准品最高点	分析物	球号	标准品最高点
GM-CSF	14	5000pg/ml	IL-5	23	2000pg/ml
CCL3/MIP-1α	25	100pg/ml	IL-6	24	2000pg/ml
CCL4/MIP-1β	34	20000pg/ml	IL-8	41	800pg/ml
IFN-γ	13	10000pg/ml	IL-10	31	800pg/ml
IL-1β	16	500pg/ml	IL-12/IL-23 p40	43	20000pg/ml
IL-2	17	4000pg/ml	IL-17A	33	4000pg/ml
IL-2RA/CD25	62	15000pg/ml	TNF-α	51	2000pg/ml
IL-4	21	2000pg/ml			

特异性

本试剂盒不与以下物质发生交叉反应

CXCL10	VEGF
IL-3	EGF
CCL27	G-CSF
CXCL1	M-CSF

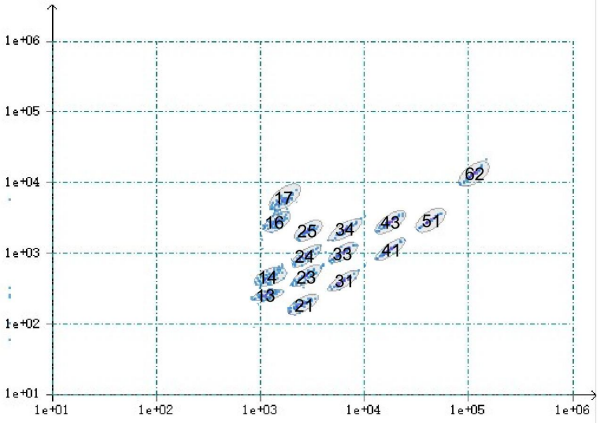
精密度

分析物	批内精密度（%CV）	分析物	批内精密度（%CV）
GM-CSF	3.84	IL-5	4.56
CCL3/MIP-1α	5.61	IL-6	4.15
CCL4/MIP-1β	4.83	IL-8	3.75
IFN-γ	2.78	IL-10	3.65
IL-1β	5.10	IL-12/IL-23 p40	4.21
IL-2	3.69	IL-17A	5.14
IL-2RA/CD25	3.74	TNF-α	4.27
IL-4	3.30		

回收率

分析物	样本量	回收率均值%	分析物	样本量	回收率均值%
GM-CSF	4	71.75	IL-5	4	81.03
CCL3/MIP-1α	4	79.54	IL-6	4	78.79
CCL4/MIP-1β	4	90.15	IL-8	4	84.99
IFN-γ	4	79.22	IL-10	4	74.72
IL-1β	4	80.85	IL-12/IL-23 p40	4	75.65
IL-2	4	75.94	IL-17A	4	83.18
IL-2RA/CD25	4	91.24	TNF-α	4	77.41
IL-4	4	85.53			

微球分布图


1e+06
1e+05
1e+04
1e+03
1e+02
1e+01
1e+01
1e+02
1e+03
1e+04
1e+05
1e+06
62
17
16
25
34
43
51
24
33
41
14
23
31
13
21