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

Catalog No.: RK05223A

用于同时检测小鼠细胞培养上清、血清或血浆中多种生物标志物的含量

version: 1.0

*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】

本试剂盒用于检测小鼠生物标本或细胞培养上清中 IL-1β、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12 p40、IL-12 p70、TNF-α、IFN-γ、CCL2/MCP-1、CCL3/MIP-1α、CCL4/MIP-1β、CCL5/RANTES、CXCL1/KC、GM-CSF 的表达。

【检测原理】

利用流式荧光原理定量检测样本中 IL-1β、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12 p40、IL-12 p70、TNF-α、IFN-γ、CCL2/MCP-1、CCL3/MIP-1α、CCL4/MIP-1β、CCL5/RANTES、CXCL1/KC、GM-CSF 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。采用流式细胞仪对其进行检测时，不同微球复合物可被识别出具体的分析物类型并获得对应的荧光强度，通过计算分析出样本中的靶点所含浓度，从而实现样本中 IL-1β、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12 p40、IL-12 p70、TNF-α、IFN-γ、CCL2/MCP-1、CCL3/MIP-1α、CCL4/MIP-1β、CCL5/RANTES、CXCL1/KC、GM-CSF 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。已开封的产品须在 1 个月内使用完。校准品复溶后 4 小时内使用。

组成	主要成分	规格与装量	
		48 T/盒	96 T/盒
微球混悬液	结合有 IL-1β、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12 p40、IL-12 p70、TNF-α、IFN-γ、CCL2/MCP-1、CCL3/MIP-1α、CCL4/MIP-1β、CCL5/RANTES、CXCL1/KC、GM-CSF 抗体的荧光微球	1 mL/支×1 支	2 mL/支×1 支
检测抗体溶液	生物素标记的 IL-1β、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12 p40、IL-12 p70、TNF-α、IFN-γ、CCL2/MCP-1、CCL3/MIP-1α、CCL4/MIP-1β、CCL5/RANTES、CXCL1/KC、GM-CSF 抗体	2.5 mL/瓶×1 瓶	5 mL/瓶×1 瓶
荧光素溶液	链霉亲和素藻红蛋白	2.5 mL/瓶×1 瓶	5 mL/瓶×1 瓶
样本稀释液	含磷酸盐稀释液	20 mL/瓶×1 瓶	20 mL/瓶×1 瓶
浓缩洗涤液（10×）	10 倍浓缩 PBST 缓冲液	20 mL/瓶×1 瓶	20 mL/瓶×1 瓶
校准品	PBS 缓冲液等稀释的 IL-1β、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12 p40、IL-12 p70、TNF-α、IFN-γ、CCL2/MCP-1、CCL3/MIP-1α、CCL4/MIP-1β、CCL5/RANTES、CXCL1/KC、GM-CSF 抗原冻干品	2 瓶	2 瓶

【实验所需的材料】

1.单通道移液器、多通道移液器和吸头

2.磁力板（可搭配 96 孔微孔板使用）或磁力架（可搭配 1.5 mL EP 管使用

3.用于样品采集或稀释用的聚丙烯微型离心管

4.去离子或蒸馏的超纯水

5.反应板

6.恒温孵育器

7.涡旋仪

8.离心机

9.配备有两个激光器的流式细胞仪：

（1）至少含有 488 nm 或 532 nm 的激光器，和 633 nm 的激光器；

（2）有相应的 PE 和 APC 以及 APC-Cy7/APC-A750 检测通道。

【重要提示】

*本产品仅用于科研，不能用于临床诊断。

1. 请留意产品标签上的有效期时间，并在有效期内使用本产品。
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. 在本实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. 请严格按照本说明书的要求进行试剂配制。如果您将分次使用试剂盒，请按需配制液体试剂，并遵循现配现用原则，试剂盒内所有组分需要在开封后的 1 个月内使用完。
15. 结果分析提示：由于本试剂盒（流式多因子检测）与 ELISA 等方法的检测原理、信号采集及校准体系不同，其测定值的绝对数值不具备直接可比性。若需进行跨方法数据比较或整合，建议采用相关性分析评估不同方法间的一致性与关联趋势。

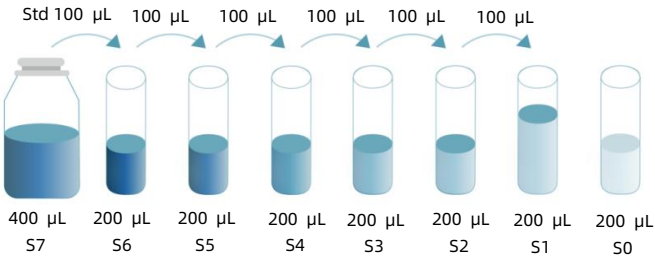
【样本收集与保存】

1. 细胞培养上清：1,000 × 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，1,000 x 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 1,000 x 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 4 小时内按临床血液样本采集要求处理并检测，若无法在 4 小时内检测，可 2-8℃下保存，注意不超过 24 小时，若超过 24 小时检测。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或干冰密封冷藏运输。
5. 其它生物体液：1,000 x g 离心 20 分钟，取上清即可检测，或将上清置于-20℃或-80℃保存，避免反复冻融。
6. 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。

校准品：向装有冻干校准品的西林瓶（标记为 S7 号）中加入 400 μL 样本稀释液复溶，静置 15 分钟，用涡旋仪轻轻涡旋 5s，重复三次，然后再取 7 支 EP 管并标记为 S6-S0 号，按照顺序排列，用于稀释校准品用；最后向 S6-S0 中各加 200 μL 样本稀释液，再依次从 S7 中取 100 μL 转移到 S6 中，用涡旋仪轻轻涡旋 5s，从 S6 中取 100 μL 转移到 S5 中，同法连续稀释至 S1，并充分混匀。S0 作为零值校准品。（注：以上倍比稀释后的液体体积若不满足实验过程中的标准曲线的复孔需求，可根据实际情况在稀释倍数不变的前提下进行取液体积的调整）



注意：校准品须现配现用，不可分装重复使用。

2. 洗涤液（1×）：在使用前用双蒸水或去离子水以 1:10 的比例稀释成 1×洗涤液，即取 1 份浓缩洗涤液加入 9 份双蒸水或去离子水。

【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：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，请按需取用试剂，并将剩余组分立即放回 2-8℃储存，防止长菌。

1. 实验前准备：将试剂盒各组份从冰箱中取出，平衡至室温（18-25℃），按要求预处理待检样本，将浓缩洗涤液（10×）按所需用量用去离子水或纯化水进行 1:10 稀释，配制成 1×工作液，备用。
2. 实验布局：根据实验方案，确定反应板上的校准品孔与样本孔布局及数量。
3. 加样与孵育：每孔中加入充分混匀的微球混悬液 20 μL，根据实

验布局设计，分别加入相应梯度的校准品或待测样本 50 μL。用提供的封板膜封闭板孔，充分混匀，置于恒温孵育器上 1200 rpm，37℃避光混匀 1 分钟，混匀后将 96 孔板置于 37℃混匀或静置避光孵育 30 分钟。反应完成后取出反应板，置于磁力板上，磁吸 2 分钟，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。

4. 洗板：按照 100 μL/孔加入 1×洗涤液，先置于恒温孵育器上 1200 rpm，震荡 1-2 分钟，后置于磁力板上磁吸 2 分钟，倾去上清，并用吸水纸吸去残留液体。

5. 加检测抗体：在反应板孔内，按照 50 μL/孔加入检测抗体溶液，贴上封板膜，置于恒温孵育器上 1200 rpm，37℃避光混匀 1 分钟，混匀后将 96 孔板置于 37℃混匀或静置避光孵育 20 分钟。反应完成后取出反应板，置于磁力板上，磁吸 2 分钟，倾去上清，并用吸水纸吸去残留液体。

6. 加荧光素溶液：在反应板孔内，按照 50 μL/孔加入荧光素溶液，贴上封板膜，置于恒温孵育器上 1200 rpm，37℃避光混匀 1 分钟，混匀后将 96 孔板置于 37℃混匀或静置避光孵育 10 分钟。反应完成后取出反应板，置于磁力板上，磁吸 2 分钟，倾去上清，并用吸水纸吸去残留液体。

7. 洗板：重复步骤 4 一次。

8. 读板：将反应板从磁力板上取下，每孔加入 200 μL 的 1×洗涤液，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 20 μL 微球混悬液

↓

每孔加入 50 μL 校准品或待测样本，37℃混匀 1 分钟，
置于 37℃混匀或静置避光孵育 30 分钟，然后洗涤 1 次

↓

添加 50 μL 检测抗体溶液，37℃混匀 1 分钟，
置于 37℃混匀或静置避光孵育 20 分钟，磁吸去上清

↓

添加 50 μL 荧光素溶液，37℃混匀 1 分钟，
置于 37℃混匀或静置避光孵育 10 分钟，洗涤 1 次

↓

添加 200 μL 的 1×洗涤液

↓

使用流式细胞仪检测

流式细胞仪参数调试及数据采集

1. 参数调试

样本上机前，可先取 20 μL 充分分散好的微球混悬液与 180 μL 洗涤缓冲液充分混匀后上机，通过调节 FSC 和 SSC 的参数找到微球对应的位置并圈门，以门内的微球为对象，通过调节 APC 通道和 APC-Cy7/APC-A750 通道的参数，根据荧光强弱找到微球分布，调节 PE 通道参数，使得所有微球群在 PE 轴上不要压线。

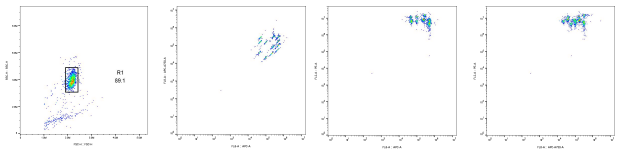


图 1：建立 X 轴为 FSC、Y 轴为 SSC 的散点图模板，圈选微球群 R1

图 2：建立 X 轴为 APC、Y 轴为 APC-A750 的散点图模板，从微球群门内圈选单靶点的细胞因子群

图 3、4：分别建立 X 轴为 APC、Y 轴为 PE；X 轴为 APC-A750、Y 轴为 PE 的散点图模板，显示门内微球，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。

2. 数据收集

各校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 15 个微球群，共计应获取 1500-3000 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 15 群微球，对应 15 种细胞因子检测微球。

（2）获取校准品或者样本各个微球群在 PE 通道下的平均荧光值。在 Excel 下输入校准品各个微球群在 PE 通道下的平均荧光值及对应的细胞因子浓度，将浓度与对应的荧光值均取对数。

检验结果解释

本产品通过对 IL-1β、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12 p40、IL-12 p70、TNF-α、IFN-γ、CCL2/MCP-1、CCL3/MIP-1α、CCL4/MIP-1β、CCL5/RANTES、CXCL1/KC、GM-CSF 校准品的测值进行标准曲线拟合。计算 IL-1β、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12 p40、IL-12 p70、TNF-α、IFN-γ、CCL2/MCP-1、CCL3/MIP-1α、CCL4/MIP-1β、CCL5/RANTES、CXCL1/KC、GM-CSF 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，需要结合症状进行分析。

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

指标	检出限（pg/mL）	指标	检出限（pg/mL）
IL-1β	≤2.5	IFN-γ	≤2.5
IL-2	≤2.5	CCL2/MCP-1	≤2.5
IL-4	≤2.5	CCL3/MIP-1α	≤2.5
IL-6	≤2.5	CCL4/MIP-1β	≤2.5
IL-10	≤2.5	CCL5/RANTES	≤2.5
IL-12 p40	≤2.5	CXCL1/KC	≤2.5
IL-12 p70	≤2.5	GM-CSF	≤2.5
TNF-α	≤2.5		

准确度

指标	回收率（%）	指标	回收率（%）
IL-1β	70%-130%	IFN-γ	70%-130%
IL-2	70%-130%	CCL2/MCP-1	70%-130%
IL-4	70%-130%	CCL3/MIP-1α	70%-130%
IL-6	70%-130%	CCL4/MIP-1β	70%-130%
IL-10	70%-130%	CCL5/RANTES	70%-130%
IL-12 p40	70%-130%	CXCL1/KC	70%-130%
IL-12 p70	70%-130%	GM-CSF	70%-130%
TNF-α	70%-130%		

线性

指标	线性（pg/mL）	指标	线性（pg/mL）
IL-1β	6.86-5000	IFN-γ	6.86-5000
IL-2	6.86-5000	CCL2/MCP-1	6.86-5000
IL-4	6.86-5000	CCL3/MIP-1α	6.86-5000
IL-6	6.86-5000	CCL4/MIP-1β	6.86-5000
IL-10	6.86-5000	CCL5/RANTES	6.86-5000
IL-12 p40	6.86-5000	CXCL1/KC	6.86-5000
IL-12 p70	6.86-5000	GM-CSF	6.86-5000
TNF-α	6.86-5000		

重复性

变异系数(CV)应不大于 10%。

批间差

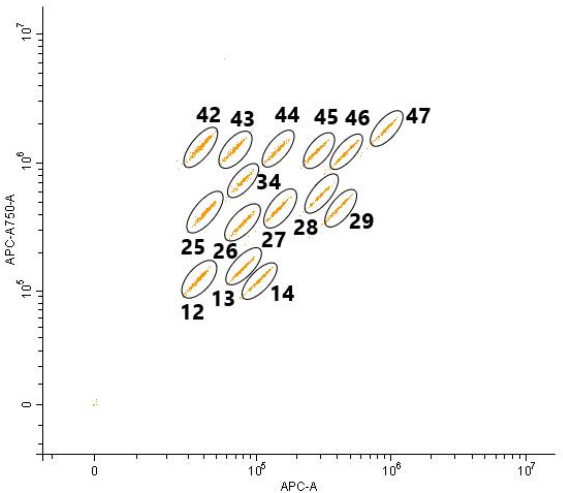
变异系数(CV)应不大于 15%。

校准品浓度

指标	球号	校准品最高点
IL-1β	12	5000 pg/mL
IL-2	13	5000 pg/mL
IL-4	14	5000 pg/mL
IL-6	25	5000 pg/mL
IL-10	26	5000 pg/mL
IL-12 p40	27	5000 pg/mL
IL-12 p70	28	5000 pg/mL
TNF-α	29	5000 pg/mL
IFN-γ	34	5000 pg/mL
CCL2/MCP-1	42	5000 pg/mL

CCL3/MIP-1α	43	5000 pg/mL
CCL4/MIP-1β	44	5000 pg/mL
CCL5/RANTES	45	5000 pg/mL
CXCL1/KC	46	5000 pg/mL
GM-CSF	47	5000 pg/mL

微球分布图



【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）操作时须做好个人安全防护，预防样本、试剂、校准品等与人体接触。

（5）实验样本、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] 吕艺,刘茜,赵敏,等.多器官功能障碍综合征小鼠血清多种细胞因子含量变化及其与病程进展的关系[J].解放军医学杂志,2014,39(07):522-526.

[2] Manglani M, Rua R, Hendricksen A, Braunschweig D, Gao Q,

Tan W, Houser B, McGavern DB, Oh K. Method to quantify cytokines and chemokines in mouse brain tissue using Bio-Plex multiplex immunoassays. Methods. 2019 Apr 1;158:22-26.

[3] Lehmann JS, Zhao A, Sun B, Jiang W, Ji S. Multiplex Cytokine Profiling of Stimulated Mouse Splenocytes Using a Cytometric Bead-based Immunoassay Platform. J Vis Exp. 2017 Nov 9;(129):56440.

[4] Preuss JM, Burret U, Vettorazzi S. Multiplex Fluorescent Bead-Based Immunoassay for the Detection of Cytokines, Chemokines, and Growth Factors. Methods Mol Biol. 2021;2261:247-262.

[5] Lehmann JS, Zhao A, Sun B, Jiang W, Ji S. Multiplex Cytokine Profiling of Stimulated Mouse Splenocytes Using a Cytometric Bead-based Immunoassay Platform. J Vis Exp. 2017 Nov 9;(129):56440.

[6] Qin H, Benveniste EN. ELISA methodology to quantify astrocyte production of cytokines/chemokines in vitro. Methods Mol Biol. 2012;814:235-49.

【基本信息】

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：400-999-6126

邮　　编：430074

【说明书核准及修改日期】

2026 年 5 月 14 日