Human Inflammatory 5-Plex Assay Kit

【产品货号】

FC10501

【靶标信息】

检测项目	缩写
白细胞介素1β	IL-1β
白细胞介素6	IL-6
白细胞介素8	IL-8
干扰素γ	IFN-γ
肿瘤坏死因子α	TNF-α

【包装规格】

48T/盒（或96T/盒）

【预期用途】

本试剂盒用于体外定量检测人血清或血浆样本中 IL-1β、IL-6、IL-8、IFN-γ、TNF-α的含量。

【检验原理】

本试剂盒以流式分析为基础，检测原理如图1所示，在特定荧光编码的微球上分别识别对应的细胞因子。当检测样品中存在特异性抗原时，这些连接荧光编码微球的捕获抗体将会与其结合，通过加入生物素标记的特异性检测抗体，形成微球连接的捕获抗体-抗原-生物素标记的检测抗体复合物。最后加入链霉亲和素标记的藻红蛋白（SA-PE）与生物素结合后，在流式细胞仪藻蓝蛋白（APC）和藻蓝蛋白-Cy7（APC-Cy7）通道下，各微球群被识别并用于判定抗原；在流式细胞仪PE通道下，微球体上PE的荧光强度与样本中各被检测物的浓度呈正相关，各校准品与其对应的荧光信号可拟合成浓度—荧光强度标准曲线，通过曲线方程可计算出各抗原的浓度。

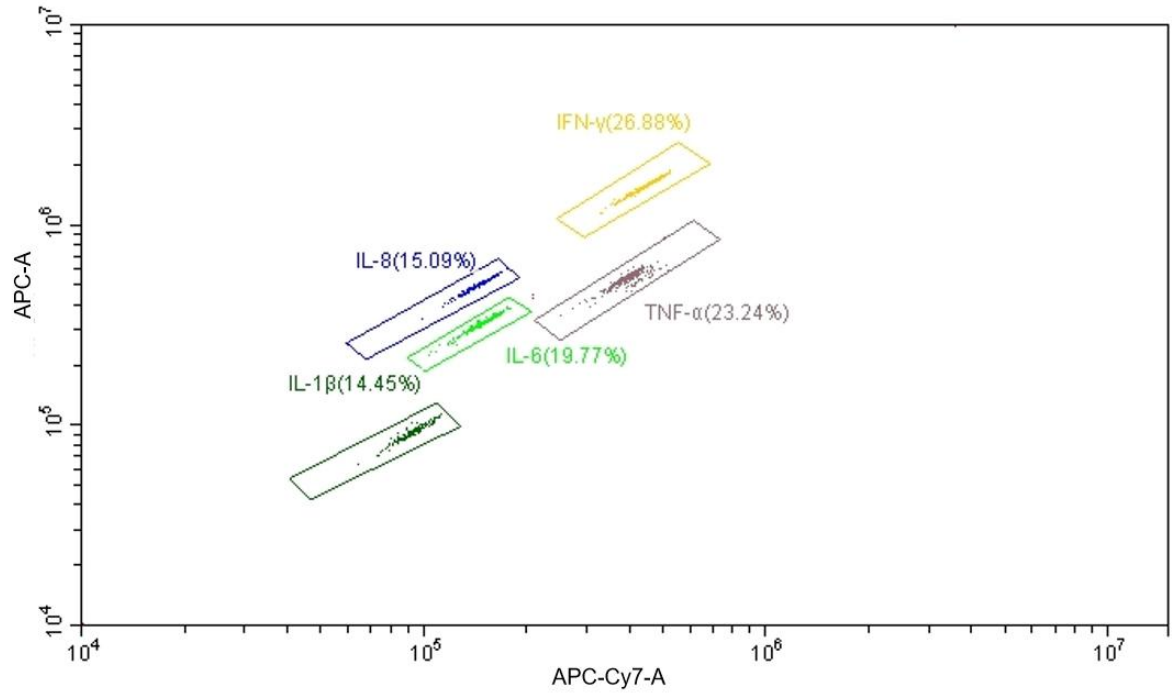

图1：荧光编码微球及对应检测物

【主要组成成分】

组分编号	试剂简称	试剂名称	规格	
			48T/盒	96T/盒
FC10501A	A液	交联抗体的荧光微球混合液	1.25 mL/瓶 ×1瓶	2.5 mL/瓶 ×1瓶
FC10501B	B液	生物素标记的荧光检测抗体混合物	1.25 mL/瓶 ×1瓶	2.5 mL/瓶 ×1瓶
FC10501C	C液	标准品稀释液	2mL/管 ×1管	2mL/管 ×1管
FC10501D	D液	SA-PE	2.5mL/瓶 ×1瓶	5.0mL/瓶 ×1瓶
FC10501E	E液	20×清洗液	12mL/瓶 ×1瓶	12mL/瓶 ×1瓶
FC10501F	F粉末	标准品冻干粉	1管	2管

注：1）不同批号的试剂请勿混用，并请在有效期范围内使用；

2）本产品需要但不提供的材料包括流式细胞管、1.5mL EP管、去离子水、96孔板、磁力架。

【储存条件及有效期】

1.本试剂盒应于2-8 ℃干燥环境下避光保存，**防止冷冻**；

2.有效期：试剂盒有效期未开封为 12 个月，有效期至见产品盒；开封后1个月内使用完；

3.运输条件为2-8℃；

【适用仪器】

流式细胞仪：含有～638 nm及488 nm双激光器的流式细胞仪，并有相应的PE和APC以及APC-Cy7检测通道。

【检验方法】

1.标准品准备

标准品为冻干粉，使用前500 ×g离心10秒使标准品集中于管底，加入200 μL去离子水，静置5分钟，再用枪头轻轻吹打2—3次使标准品完全溶解，获得5,000 pg/mL的标准品液（标记为1号管）；再取9个EP管（标记为2-10），并加入40 μL C液（标准品稀释液），由1号管依次转移40 μL至下一管混匀，直到9号管混匀为止；最后，向10号管再加入40 μL C液（标准品稀释液）。

管号	梯度稀释	标准品稀释液（μL）	加入内容物来源及体积（μL）	最终浓度（pg/mL）
A1	TOP	/	校准品瓶200μL	5,000
A2	1:2	40μL	A1号管 40μL	2,500
A3	1:4	40μL	A2号管 40μL	1,250
A4	1:8	40μL	A3号管 40μL	625
A5	1:16	40μL	A4号管 40μL	312
A6	1:32	40μL	A5号管 40μL	156
A7	1:64	40μL	A6号管 40μL	78
A8	1:128	40μL	A7号管 40μL	39
A9	1:256	40μL	A8号管 40μL	20
A10	/	40μL	标准品稀释液 40μL	0

2.实验前处理

2.1 样本前处理：对于超出检测线性范围的细胞因子高浓度样本用标准品稀释液（C液）适当稀释。

2.2 “1×清洗液”配制：使用超纯水/蒸馏水将20×清洗液（E液）稀释20倍配制成1×清洗液，轻轻混匀，避免泡沫。转移至干净瓶内。2-8℃贮存，1×洗液可稳定保存30天。

3.实验操作步骤

3.1磁力吸附清洗法（强力推荐此方法；若无磁力架，可采用离心清洗法替代，详见3.2节）：

3.1.1将A液（交联抗体的荧光微球混合液）充分涡旋分散均匀；

3.1.2 根据标准品和样本量计算A液、B液（生物素标记的荧光检测抗体混合物）和D液（SA-PE）需要的总体积（每个样本需要25 μL A液、25 μL B液和50 μL D液）。

3.1.3 往每个孔中加入25 μL细胞上清样本或25 μL血清样本或25 μL不同浓度的校准品，紧接着再加入25 μL A液并迅速用移液器轻轻混匀（注意不要产生气泡），盖上盖子，室温避光震荡（200 rpm或灵活调节）孵育1小时；

3.1.4 往每个孔中加入25 μL B液，并迅速用移液器轻轻混匀（注意不要产生气泡），盖上盖子，室温避光震荡（200 rpm或灵活调节）孵育1小时；

3.1.5 用多通道排枪往孵育好的每管中加入0.2 mL 1×清洗液，将96孔板放入磁力架静置1分钟，弃去上清，从磁力架上取下96孔板，再次加入0.2 mL1×清洗液，并再次将96孔板放入磁力架静置1分钟，弃去上清，从磁力架上取下96孔板，重复清洗共三次；

3.1.6 往每个孔中加入50 μL D液（SA-PE），盖上盖子，室温避光震荡（200 rpm或灵活调节）孵育1小时；

3.1.7 重复步骤3.1.5后，加入100μL 1×清洗液分散微球并转移至流式管或者离心管中上机检测，用慢速检测。

3.2 离心清洗法 （无磁力架时采用）

3.2.1 将A液（交联抗体的荧光微球混合液）充分涡旋分散均匀；

3.2.2 根据标准品和样本量计算A液、B液（生物素标记的荧光检测抗体混合物）和D液（SA-PE）需要的总体积（每个样本需要25 μL A液、25 μL B液和50 μL D液）。

3.2.3 往每个管中加入25 μL细胞上清样本或25 μL血清样本或25 μL不同浓度的校准品，紧接着再加入25 μL A液并迅速用移液器轻轻混匀（注意不要产生气泡），盖上盖子，室温避光震荡（200 rpm或灵活调节）孵育1小时；

3.2.4 往每个管中加入25 μL B液，并迅速用移液器轻轻混匀（注意不要产生气泡），盖上盖子，室温避光震荡（200 rpm或灵活调节）孵育1小时；

3.2.5 往孵育好的各离心管中加入800 μL 1×清洗液，漩涡混匀，2000 g离心2分钟，小心吸去上清（底部可见褐色的小点沉淀即为磁性荧光编码微球）；

3.2.6 往每个管中加入50 μL D液（SA-PE），盖上盖子，室温避光震荡（200 rpm或灵活调节）孵育1小时；

3.2.7 重复步骤3.2.5两次后，加入100 μL 1×清洗液（E液）混匀，准备上机，用慢速检测。

4 流式参数调试及数据采集

4.1 参数调试

样本上机前，可先取5 μL充分分散好的A液并用E液稀释成100 μL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5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（PE荧光峰能完全显示，如图2）。

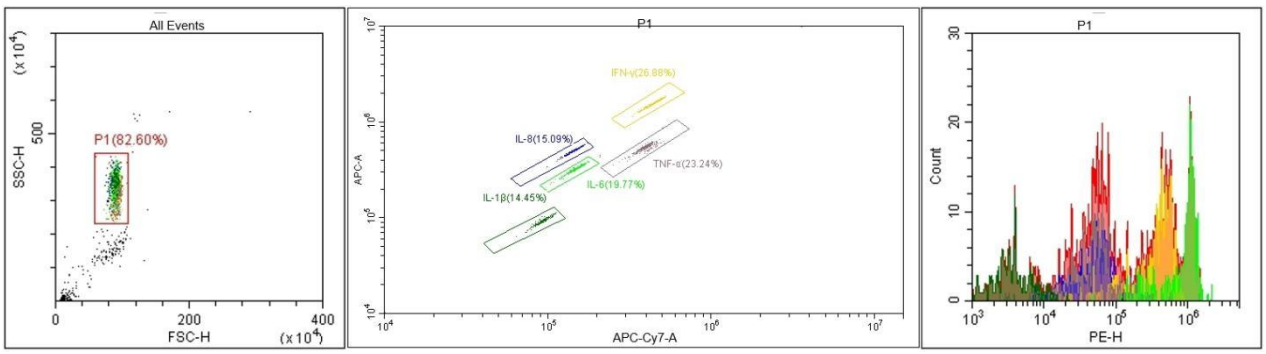

图2：流式细胞仪参数调试

4.2 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5个微球群，共计获取500—1000个微球数据。

5. 数据处理

本试剂盒所获得的数据手动分析过程如下：

（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5群微球，对应为5个细胞因子的微球群。

（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（MFI）。在FCAP Array软件或者Excel下输入标准品各个微球群在PE通道下的平均荧光值（MFI）及对应的细胞因子浓度，进行多参数拟合分析，并确保拟合度R^2值不低于95%。

【检验方法的局限性】

1.本试剂盒的检测结果仅供科研使用，对患者的临床诊治应结合其症状/体征、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑，**高脂、黄疸、溶血**等血清样本不适用于检测；

2.不当的样本采集、转运、储存、处理过程以及仪器的设置均有可能导致错误的检测结果；

3.该试剂检测结果不得作为患者病情评价的唯一指标。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于科学研究检测；
2. 样本、质控/校准品、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. 仪器须经正确校准通过后方可使用。未经校准或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；
4. 本品含防腐剂及荧光素，切勿直接接触皮肤或沾染食物，操作时务必戴手套操作；
5. 推荐用聚丙烯管制备样本，勿用玻璃管或器皿；
6. 在重悬校准品成溶液或进行校准品样品稀释时，不可采用振动混匀及剧烈吹打的方式处理校准品样品，只需轻轻吹打样品数次即可；
7. 校准品在配成溶液后，请在4h内使用；
8. 在使用之前，捕获微球混合液必须充分的振动混合；
9. 检测标本加样完毕后为充分孵育，必须在孵育前对所有检测管进行振动混匀；
10. 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；
11. 不同批号的试剂请勿混用，并请在有效期范围内使用；
12. 本试剂盒注意保存温度，不能冷冻。