

# Human Th1/Th2/Th17 7-Plex Assay Kit

**【产品货号】**

FC10701

**【靶标信息】**

检测项目	缩写
白细胞介素2	IL-2
白细胞介素4	IL-4
白细胞介素6	IL-6
白细胞介素10	IL-10
白细胞介素17A	IL-17A
干扰素 $\gamma$	IFN- $\gamma$
肿瘤坏死因子 $\alpha$	TNF- $\alpha$

**【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-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17A、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  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连接对应的人细胞因子。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。

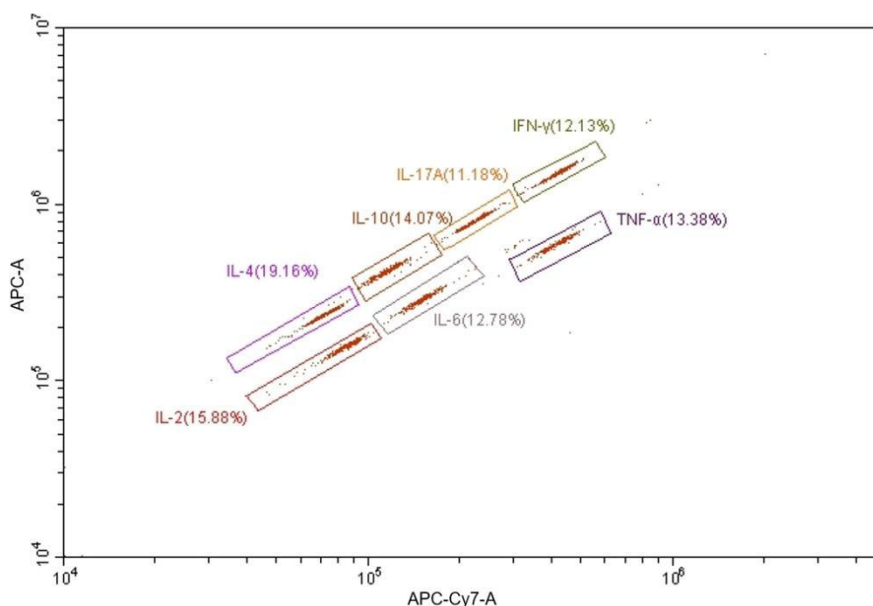


图1: 荧光编码微球及对应检测物



**【主要组成成分】**

组分编号	试剂简称	试剂名称	规格	
			48T/盒	96T/盒
FC10701A	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
FC10701B	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
FC10701C	C液	标准品稀释液	2mL/管 ×1管	2mL/管 ×1管
FC10701D	D液	SA-PE	2.5mL/瓶 ×1瓶	5.0mL/瓶 ×1瓶
FC10701E	E液	20×清洗液	12mL/瓶 ×1瓶	12mL/瓶 ×1瓶
FC10701F	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 °C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°C;

**【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°C贮存, 1×清洗液可稳定保存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  $\mu$ L A液、25  $\mu$ L B液和50  $\mu$ L D液）。

3.1.3 往每个孔中加入25  $\mu$ L细胞上清样本或25  $\mu$ L血清样本或25  $\mu$ L不同浓度的校准品，紧接着再加入25  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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 $\times$ 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 mL 1 $\times$ 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  $\mu$ L 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100  $\mu$ L 1 $\times$ 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  $\mu$ L A液、25  $\mu$ L B液和50  $\mu$ L D液）。

3.2.3 往每个管中加入25  $\mu$ L细胞上清样本或25  $\mu$ L血清样本或25  $\mu$ L不同浓度的校准品，紧接着再加入25  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L 1 $\times$ 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L 1 $\times$ 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  $\mu$ L充分分散好的A液并用E液稀释成100  $\mu$ L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7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-A荧光峰能完全显示，如图2）。

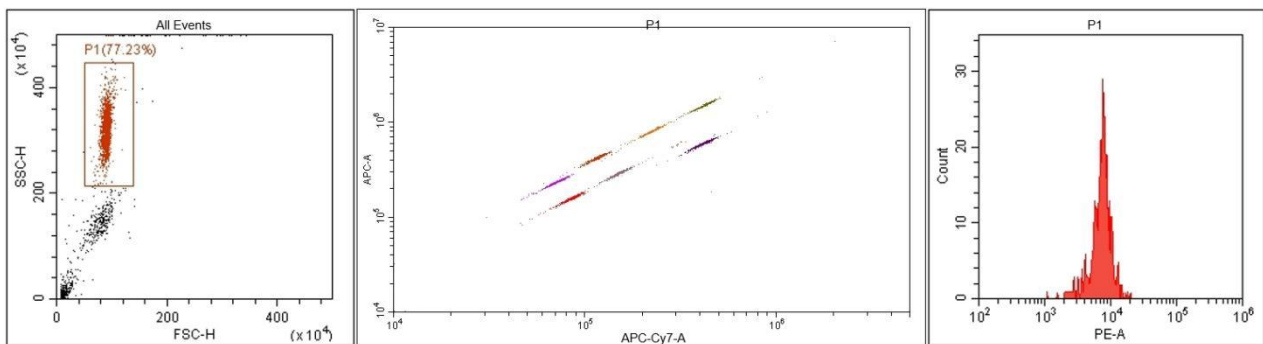


图2: 流式细胞仪参数调试

### 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7个微球群，共计获取700—1400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7群微球，对应为7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。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，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。