

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

**【产品货号】**

FC20701

**【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小鼠血清或血浆样本中 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小鼠细胞因子。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。

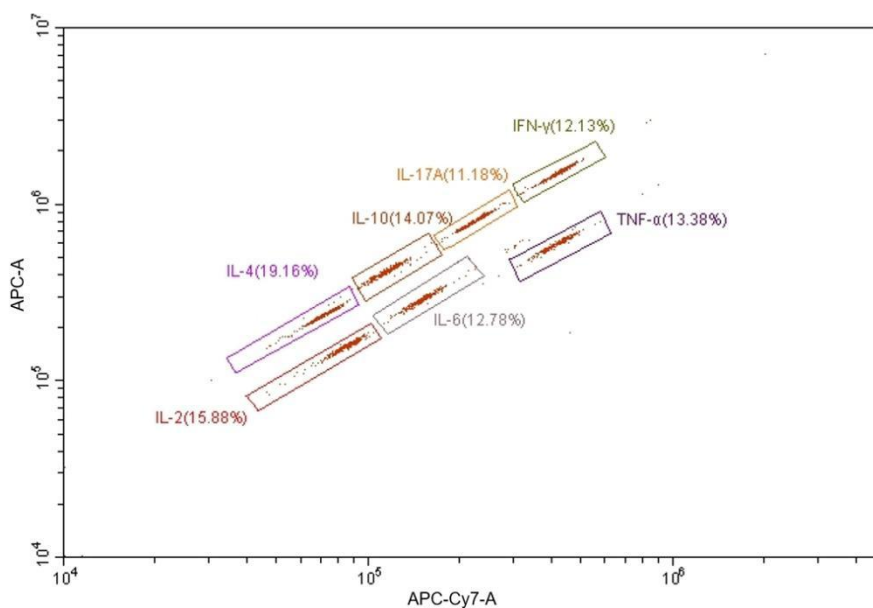


图1: 荧光编码微球及对应检测物



**【主要组成成分】**

组分编号	试剂简称	试剂名称	规格		
			24T/盒	48T/盒	96T/盒
FC21201A	A液	交联抗体的荧光微球混合液	0.6 mL/管 ×1管	1.25 mL/管 ×1管	2.5 mL/瓶 ×1管
FC21201B	B液	生物素标记的荧光检测抗体混合物	0.6 mL/管 ×1管	1.25mL/管 ×1管	2.5mL/瓶 ×1管
FC21201C	C液	标准品稀释液	1mL/管 ×1管	2mL/管 ×1管	2mL/管 ×1管
FC21201D	D液	SA-PE	1.25mL/瓶 ×1瓶	2.5mL/瓶 ×1瓶	5.0mL/瓶 ×1瓶
FC21201E	E液	20×清洗液	5mL/瓶 ×1瓶	12mL/瓶 ×1瓶	12mL/瓶 ×1瓶
FC21201F	F粉末	标准品冻干粉	1管	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2500 pg/mL的标准品液(标记为1号管); 再取7个EP管(标记为2-8), 并加入40 μL标准品稀释液(C液), 由1号管依次转移40 μL至下一管混匀, 直到8号管混匀为止。

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120μL	2500
A2	1:2	40μL	A1号管 40μL	1250
A3	1:4	40μL	A2号管 40μL	625
A4	1:8	40μL	A3号管 40μL	312
A5	1:16	40μL	A4号管 40μL	156
A6	1:32	40μL	A5号管 40μL	78
A7	1:64	40μL	A6号管 40μL	39
A8	1:128	40μL	A7号管 40μL	20

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(强烈推荐此方法; 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液充分涡旋分散均匀;

3.1.2 根据标准品和样本量计算A液与B液需要的总体积(每个样本需要25 μL A液和25 μL B液), 将A液和B液充分混合再分装(例如: 一共有10个样本, 取250 μL A液和250 μL B液轻轻混匀, 然后再用96孔板将所得混合液按每孔50 μL分装)。

3.1.3 往分装有A、B混合液的孔中加入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，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2小时；

3.1.4 空白孔准备：将A液涡旋分散均匀，往设定的96孔板孔中加入25微升预先分散均匀的A液，再加入50微升标准品稀释液孵育2小时；

3.1.5 用多通道排枪往孵育好的样本、标准品或者空白孔中加入0.2 mL 1 $\times$ 清洗液（E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 往样本、标准品或者空白孔中加入50  $\mu$ L SA-PE（D液），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，并最终加入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液充分涡旋分散均匀；

3.2.2 根据标准品和样本量计算A液与B液需要的总体积（每个样本需要25  $\mu$ L A液和25  $\mu$ L B液），将A液和B液充分混合再分装（例如：一共有10个样本，取250  $\mu$ L A液和250  $\mu$ L B液轻轻混匀，然后再用1.5 mL离心管将所得混合液按每孔50  $\mu$ L分装）；

3.2.3 往分装有A、B混合液的离心管中加入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，并迅速用移液器轻轻混匀（注意不要产生气泡），室温避光震荡孵育2小时；

3.2.4 空白孔准备：将A液涡旋分散均匀，往设定的离心管中加入25微升预先分散均匀的A液，再加入50微升标准品稀释液孵育2小时；

3.2.5 往孵育好的离心管中加入800  $\mu$ L 1 $\times$ 清洗液（E液），旋涡混匀，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 往样本、标准品或者空白孔中加入50  $\mu$ L SA-PE（D液），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 往孵育好的离心管中加入800  $\mu$ L 1 $\times$ 清洗液，旋涡混匀，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），重复两次；

3.2.8 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）。

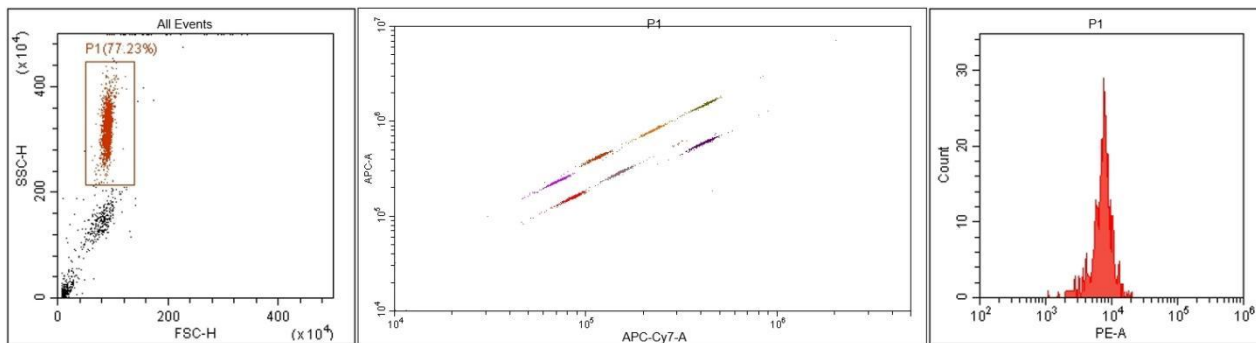


图2：流式细胞仪参数调试

##### 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以10为底的对数。具体分析以IL-6为例：



表1 IL-17A浓度及对应的PE通道荧光值

IL-17A浓度 (pg/mL)	平均荧光值	扣除空白后荧光值 (平均荧光值 - 浓度为零时荧光值)	扣除空白后荧光值对数	浓度对数
2500	1274147	1272457	6.10	3.40
1250	726524	724834	5.86	3.10
625	397451	395761	5.60	2.80
312	204768	203078	5.31	2.49
156	135386	133696	5.13	2.19
78	65236	63546	4.80	1.89
39	41674	39984	4.60	1.59
20	17523	15833	4.20	1.29
0	1690	0		

(3) 获得的两列对数值进行线性拟合得到方程 (R值不小于0.98), 利用该方程计算各检测样本中细胞因子的浓度。

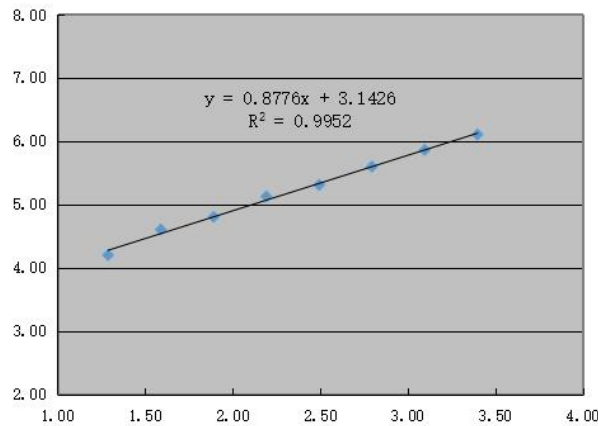


图3 IL-17A的标准曲线 (x轴为浓度的对数, y轴为PE通道扣除空白后的荧光值对数)

**【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。