

Mouse Inflammatory 12-Plex Assay Kit

【产品货号】

FC21201

【靶标信息】

检测项目	缩写
白细胞介素1	IL-1 β
白细胞介素2	IL-2
白细胞介素4	IL-4
白细胞介素5	IL-5
白细胞介素6	IL-6
粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子	GM-CSF
白细胞介素10	IL-10
白细胞介素12p70	IL-12p70
白细胞介素17A	IL-17A
单核细胞趋化蛋白 - 1	MCP-1
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小鼠血清或血浆样本中 IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、GM-CSF、IL-10、IL-12p70、IL-17A、TNF- α 、MCP-1、IFN- γ 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，通过加入藻红蛋白（SA-PE）标记的特异性检测抗体，形成微球连接的捕获抗体-抗原-检测抗体复合物。最后，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。

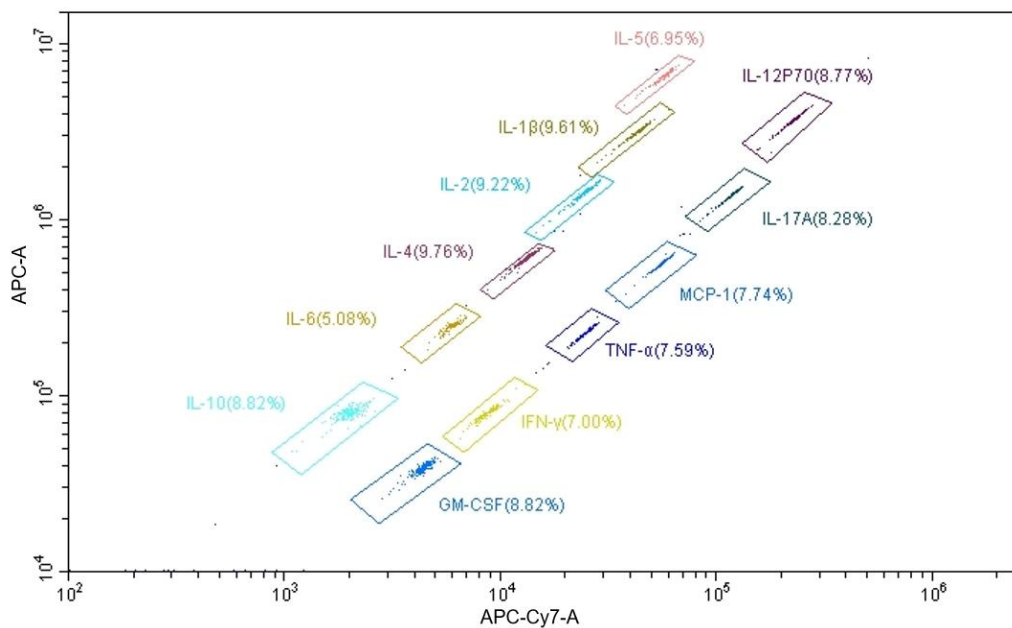


图1: 荧光编码微球及对应检测物

【主要组成成分】

组分编号	试剂简称	试剂名称	规格	
			48T/盒	96T/盒
FC21201A	A液	交联抗体的荧光微球混合液	1.25 mL/管 ×1管	2.5 mL/管 ×1管
FC21201B	B液	SA-PE标记的荧光检测抗体混合物	1.25mL/管 ×1管	2.5mL/管 ×1管
FC21201C	C液	标准品稀释液	1mL/管 ×1管	2mL/管 ×1管
FC21201E	E液	20×清洗液	12mL/瓶 ×1瓶	12mL/瓶 ×1瓶
FC21201F	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120 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2,500 pg/mL的标准品液（标记为1号管）；再取8个EP管（标记为2-9），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9号管混匀为止；10号管不含有标准品的空白稀释液。

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	2,500
A2	1:2	40μL	A1号管 40μL	1,250
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
A9	1:256	40μL	A8号管 40μL	10
A10	/	80μL	/	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℃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 μ L细胞上清样本或25 μ L血清样本或25 μ L不同浓度的校准品或25 μ L空白稀释液（空白孔），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3小时；

3.1.4 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，并最终加入100 μ L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 μ L A液和25 μ 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 μ L A液和250 μ 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 μ L分装）；

3.2.3 往分装有A、B混合液的离心管中加入25 μ L细胞上清样本或25 μ L血清样本或25 μ L不同浓度的校准品或25 μ L空白稀释液（空白孔），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3小时；

3.2.4 往孵育好的离心管中加入800 μ L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），重复两次，再加入100 μ L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 μ L充分分散好的A液并用E液稀释成100 μ 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12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）。

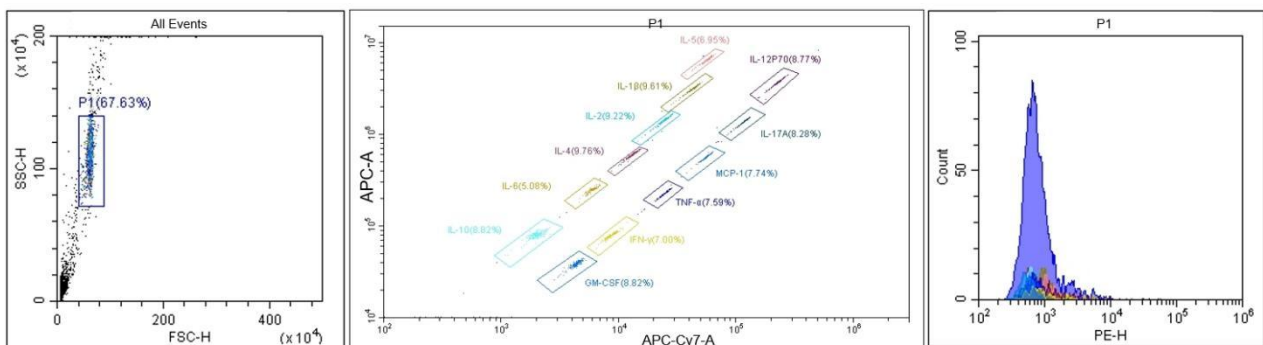


图2：流式细胞仪参数调试

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12个微球群，共计获取1200-2400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12群微球，对应为12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，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。