



小鼠六项细胞因子检测试剂盒

流式荧光发光法

货号：MFM001

规格：48T/96T

储存条件及有效期：2-8℃，避光保存，有效期 18 个月。开瓶后避光 2-8℃保存，可保存不超过 30 天。

试剂盒组成：

序号	试剂盒组成	组分	48T	96T
A	捕获微球混合液	偶联 mouse TNF-α、IFN-γ、IL-6、IL-10、IL-12、MCP-1 各抗体的微球	2.5mL	5mL
B	检测抗体混合液	生物素化 mouse TNF-α、IFN-γ、IL-6、IL-10、IL-12、MCP-1 检测抗体	5mL	10mL
C	标准品	mouse TNF-α、IFN-γ、IL-6、IL-10、IL-12、MCP-1 细胞因子重组蛋白冻干粉	1 套	2 套
D	PE 标记链霉亲和素	SAV-PE	5mL	10mL
E	空白微球	微球	0.3mL	0.3mL
F	标准品/样品稀释液	-	16mL/瓶×1 瓶	16mL/瓶×2 瓶
G	20×洗液	-	25mL/瓶×1 瓶	25mL/瓶×1 瓶
H	微孔板	-	96 孔/块×1 块	96 孔/块×1 块
I	封板膜	-	4 张	4 张

注：试剂盒中不包括，但试验需要的材料：流式管，15mL 离心管，1.5mL EP 管，锡箔纸，磁力板。

产品介绍：

本试剂盒采用 CBA 多因子流式检测技术，微球荧光编码不同，不同微球群上包被 mouse TNF-α/IFN-γ/IL-6/IL-10/IL-12/MCP-1 特异性抗体，与待测样本孵育，可与样本中 mouse TNF-α/IFN-γ/IL-6/IL-10/IL-12/MCP-1 特异性结合，之后加入生物素标记的检测抗体，形成抗体包被微球-细胞因子-检测抗体的免疫复合物；最后加入藻红蛋白标记的链霉亲和素，与生物素结合，通过流式细胞仪检测，获得待测物的荧光强度，荧光强度与样本中 mouse TNF-α/IFN-γ/IL-6/IL-10/IL-12/MCP-1 的含量成正比，最后结合这六种细胞因子标准品的标准曲线，从而实现对待测样本中 mouse TNF-α/IFN-γ/IL-6/IL-10/IL-12/MCP-1 的定量检测，从而辅助判断机体的免疫功能状态。

预期用途：

检测小鼠生物标本中 TNF-α/IFN-γ/IL-6/IL-10/IL-12/MCP-1 的表达水平。

适用机型：

本品适用于市面上的大多数有 PE 和 APC 通道的流式细胞仪。

样本要求：

血清：建议 4-6 小时内检测，如无法及时检测请-20℃冻存，忌反复冻融。

检验方法：

1. 洗液（1×）的准备

颠倒混合标有 20×洗液的瓶子。在 475mL 蒸馏水中加入 20×洗液 25mL，并轻轻混合以免起泡沫。储存于 2-8℃待用。

2. 标准品制备（准备 8 个 1.5mL EP 管分别编号 1、2、3、4、5、6、7、8）

2.1 取出标准品冻干粉（1000pg/支），每个因子用 20μL 标准品/样品稀释液溶解，充分混匀，室温放置 10 分

钟，将溶解后的六个因子转移至 1 号管，并补 80μL 标准品/样品稀释液，作为标准品最高浓度 5000pg/mL。

2.2 其他 7 个（2-8 号）EP 管中分别加入 150μL 标准品/样品稀释液，准备梯度稀释标准品。

2.3 在 1 号管中转移 50μL 标准品到 2 号管充分混匀，再在 2 号管转移 50μL 到 3 号管充分混匀。以同样方式依次连续稀释到 7 号管。

管号	上管标准品 (μL)	标准品/样品稀释液 (μL)	稀释比例(对比 1 号)	浓度 (pg/mL)
1	-	-	-	5000
2	50	150	1:4	1250
3	50	150	1:16	312.5
4	50	150	1:64	78.13
5	50	150	1:256	19.53
6	50	150	1:1024	4.88
7	50	150	1:4096	1.22
8	-	150	-	0

3. 样本处理

建议对于血清或血浆样本需使用标准品/样品稀释液进行 2 倍稀释。

表 1

样本	稀释比例 1:1	稀释倍数
血清或血浆样本	25μL 样本+25μL 标准品/样品稀释液	2

4. 操作步骤

- * 实验前将所有试剂取出平衡至室温；
- * CBA 用 96 孔板需要卡进磁力板并和磁力板贴好；
- * 孵育过程中，板子应注意避光；
- * 建议实验前先上机空白微球 50μL，调节好电压找到各群微球，保证微球群的群数与说明书一致，然后再进行实验。

4.1 从梯度稀释好的标准品 1-8 号管中分别取出 50μL 移入对应的 96 孔板孔中。

4.2 其余样本孔每孔加入稀释好的血清或血浆样本 50μL。

4.3 涡旋微球 30s，每孔加入 50μL 微球，现每孔体积应为 100μL/孔（加微球过程中应随时涡旋微球管，避免微球沉降，建议每加 4 个孔，涡旋混匀一次微球）。

4.4 将 96 孔板放到摇床上 450rpm/min 摇 2min 后，放入 37℃温箱，避光孵育 30min。

4.5 将 96 孔板卡在磁力板上 5min，去除上清（**注意：**去除上清时，需要先甩去孔中的上清，然后在吸水纸上倒扣，此过程 96 孔板要卡在磁力板中）。

4.6 将 96 孔板从磁力板上取下，每孔加入 200μL 洗液。

4.7 将 96 孔板卡在磁力板上静置 5min，去除上清（参考步骤 4.5）。

4.8 将 96 孔板从磁力板上取下，每孔加入 100μL 检测抗体。

4.9 将 96 孔板放到摇床上 450rpm/min 摇 2min 后，放入 37℃温箱，避光孵育 30min。

4.10 重复步骤 4.5-4.7。

4.11 将 96 孔板从磁力板上取下，每孔加入 100μL 藻红蛋白标记的链霉亲和素。

4.12 将 96 孔板放到摇床上 450rpm/min 摇 2min 后，放入 37℃温箱，避光孵育 15min。

4.13 重复步骤 4.5-4.7。

4.14 每孔加入 200μL 洗液重悬样本，上流式细胞仪检测（**注意：**上机前应确保 PE 电压合适，保证微球群在 PE 通道的检测范围内）。

5. 流式细胞仪检测

5.1 微球群分布：

表 2

特异性	微球位置	微球所属区域
mouse IL-12P70	L1	R1
mouse TNF- α	L2	R2
mouse IFN- γ	L3	R2
mouse MCP-1	L4	R2
mouse IL-10	L5	R2
mouse IL-6	L6	R2

注：微球内部用不同强度的荧光染料染色。

5.2 模板建立（可参考）：

- (1) 建立 X 轴为 FSC-H、Y 轴为 FSC-A 的密度图模板，设定门，不包含碎片和黏连的微球，如下图 1；
- (2) 建立 X 轴为 FSC-H、Y 轴为 SSC-H 的线性密度图模板，设定混合微球位置 R1，R2，如下图 2；
- (3) 建立两个 PE（X 轴）和 APC（Y 轴）的对数密度图模板，分别显示 R1 门或 R2 门内微球，使得微球群能够清楚明显的分布于散点图上，显示各因子 PE 荧光强度。如图 3，图 4。

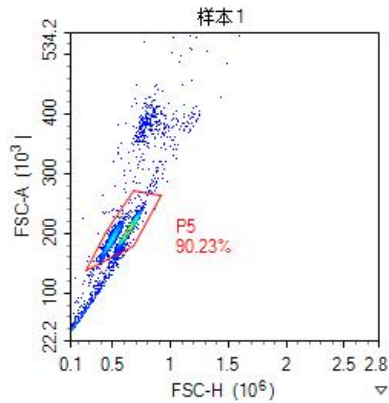


图 1

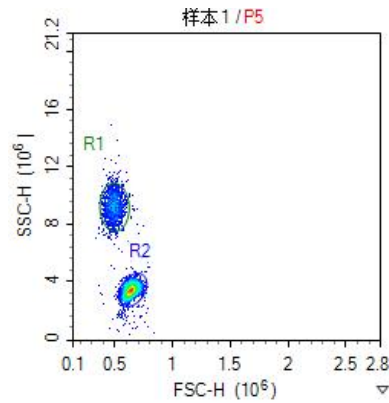


图 2

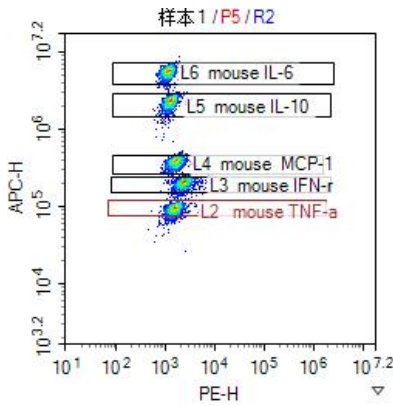


图 3

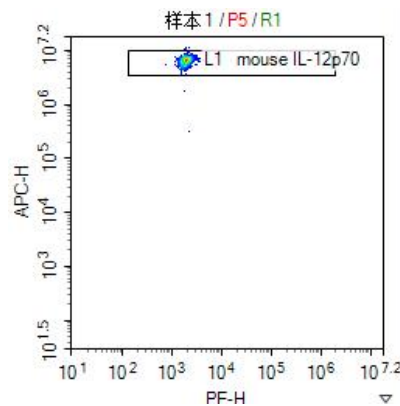


图 4

5.3 样品的检测结果分析

各标准品及样本依次上机检测，对于每种微球群，应最少获取 100 个微球。利用标准品梯度作标曲，计算样本检测结果。

检测结果的解释：

1. 待检测样本细胞因子的测定在表 3 检测范围内，测定结果有效，可直接报告测定结果；若检测结果超出检测范围，应用标准品/样品/微球稀释液将样本稀释适当的倍数重新检测；若待测样本的检测结果低于检测下限或未检测到，则直接报告为≤最低检测值。

表 3

特异性	检测范围
mouse IL-12P70	4.88pg/mL-5000pg/mL
mouse TNF- α	19.53pg/mL-5000pg/mL
mouse IFN- γ	19.53pg/mL-5000pg/mL
mouse MCP-1	19.53pg/mL-5000pg/mL
mouse IL-10	4.88pg/mL-5000pg/mL
mouse IL-6	4.88pg/mL-5000pg/mL

2. 建议：负责数据揭示和出具报告的实验人员需经过正规的技术培训。

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错误的检测结果。

产品性能指标：

1. 外观和性状

试剂盒各组份应齐全、完整，液体无渗漏；外包装应完整、无破损，标签应清晰、易识别。

2. 装量

应符合要求，不低于标示值。

3. 准确度

使用本试剂盒检测已知浓度的样本，其检测结果相对偏差在 $\pm 15\%$ 以内。

4. 重复性

本试剂盒检测 TNF- α /IFN- γ /IL-6/IL-10/IL-12/MCP-1 变异系数（CV）应 $\leq 15\%$ 。

注意事项：

1. 实验样本、质控/标准品、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。

2. 流式细胞仪未经正确校准、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。请参考该仪器操作规程进行校准，确保仪器在使用前处于最佳检测状态。

3. 本品含荧光素，切勿直接接触皮肤或污染食物，操作时务必戴手套操作。

4. 标准品在配成溶液后，请在 10 小时内使用。

5. 在使用之前，捕获微球混合液必须充分的振动混合。

6. 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。

7. 不同批号的试剂请勿混用，并请在有效期范围内使用。