

ABplex Human Cytokine 7-Plex Assay Kit

Catalog NO.: RK04295

version: 2.0

*使用前，请务必阅读产品包装内说明书

产品简介

本试剂盒产品用于测定人体生物标本中 IL-10、IL-6、IL-2、IFN- γ 、IL-4、TNF- α 、IL-17A 的含量。

产品检测原理

采用流式荧光原理定量测定人体生物标本中 IL-10、IL-6、IL-2、IFN- γ 、IL-4、TNF- α 、IL-17A 的含量。第一步，将样本和结合捕获抗体的微球混悬液混合，样本中的分析物与微球上特异性捕获抗体结合；第二步，添加检测抗体，检测抗体与第一步的反应产物特异性结合；第三步，添加荧光素溶液，荧光素上链霉亲和素与检测抗体上的生物素结合，最终形成“微球表面的捕获抗体-抗原-生物素化抗体-链霉亲和素荧光素”复合物。采用流式仪对其进行检测时，不同微球复合物可被识别出具体的分析物类型并分析对应的浓度，实现样本中 IL-10、IL-6、IL-2、IFN- γ 、IL-4、TNF- α 、IL-17A 的定量检测。

试剂盒组分及保存条件

2-8℃避光保存，避免冷冻。未开封前，试剂盒中所有成分有效期六个月。校准品复溶后请于 24 小时内使用。

组分	主要成分	规格与数量
		100T/盒
微球混悬液	结合有 IL-10、IL-6、IL-2、IFN-γ、IL-4、TNF-α、IL-17A 抗体的荧光微球	0.5ml/支 ×1 支
检测抗体溶液	生物素标记的 IL-10、IL-6、IL-2、IFN-γ、IL-4、TNF-α、IL-17A 抗体	5ml/支 ×1 支
荧光素溶液	链霉亲和素藻红蛋白	5ml/支 ×1 瓶
样本稀释液	含 BSA 的稀释液	20ml/支 ×1 瓶
浓缩洗涤液 (20X)	20 倍浓缩 PBS 缓冲液	50ml/支 ×1 瓶
校准品	BSA、PBS 缓冲液等稀释的 IL-10、IL-6、IL-2、IFN-γ、IL-4、TNF-α、IL-17A 抗原冻干品	2 瓶
说明书	1	

实验所需的材料

1. 可调式微量移液器，0.5-10ul、10-100ul、20-200ul、100-1000ul。
2. 移液器吸头。
3. 反应板。
4. 封板模。
5. 恒温孵育器（200-1500rpm；RT+50°C）。
6. 磁力板

重要提示

***本产品仅用于科研，不能用于临床诊断。**

1. 请留意产品标签上的有效期时间，并在有效期前使用本产品。
2. 请勿将不同批次或者来自不同厂家的试剂混合使用。
3. 如测试获得的样本浓度值超过了产品的最高检测限，请使用产品中的样本稀释液对样本进行稀释。所以，在正式测试样本前，建议先进行样本的预测试。
4. 实验过程中的加样、洗板、孵育时间、孵育温度等操作均会对最终结果造成影响，请严格管理实验流程并做好记录。
5. 样本的收集、处理及保存均会对检测结果产生影响，请务必严格管理样本的处理过程。
6. 在本试验中对所有因素进行试验之前，不能排除干扰的可能性。
7. 相关试剂中可能存在有害物质，使用中请注意佩戴手套，必要时佩戴护目镜。
8. 为保证最佳检测效果，相关试剂组分的保存请参照标签或是说明书。
9. 试剂配制后的混匀对检测结果非常重要，但部分蛋白或是抗体可能对剧烈的涡旋非常敏感，可能造成活性损失，请谨慎使用涡旋。
10. 请使用灭菌的耗材进行试剂配制，以免造成试剂污染，影响最终检测结果。
11. 为保证最佳检测效果，溶解后的标准品及相关试剂的工作液不建议冻存后重复使用。

12. 产品在储存或是使用中，请注意避光。
13. 为保证最佳检测效果，在加不同样本时，请注意更换吸头。
14. 请严格按照说明书的要求进行试剂配制。如果您将分次使用试剂盒，请使用封口袋密封好预包被板，并且在开封后的 1 个月内使用完。

样本收集与保存

1. 细胞培养上清：

1000 xg 离心 10 分钟，及时检测；或将样本置于-20 至-70℃中分装保存（24 小时内检测可置于 2-8℃），避免反复冻融。如果细胞培养上清样本的稀释度比较大，可先用培养基进行中间的稀释，最后用样本稀释液稀释。

2. 血清：

使用血清分离管，分离血清前让样品凝结 30 分钟，1000 xg 离心 10 分钟并及时检测；或将样本置于-20℃至-70℃中分装保存（24 小时内检测可置于 2-8℃），避免反复冻融。

3. 血浆：

收集血浆时用 EDTA 或肝素作为抗凝剂，在 30 分钟内 1000 xg 离心 15 分钟收集样本，及时检测；或将样本置于-20℃至-70℃中分装保存（24 小时内检测可置于 2-8℃），避免反复冻融。

4. 其它生物体液：

1000xg 离心 20 分钟，取上清即可检测，或将上清置于-20℃ 或-80℃保存，避免反复冻融。

5. 避免使用溶血、高血脂血清/血浆样本。

试剂准备

校准品：用样本稀释液复溶，复溶体积及各指标的浓度见相应校准品瓶签，轻轻混匀 30s，避免产生气泡，静置 10-15min。准备 11 支 EP 管并标记为 1-11 号，用于 2 倍梯度稀释校准品，向管 1 中加入 300ul 复溶校准品，向管 2-10 中各加入 150ul 样本稀释液，从管 1 中取 150ul 转移到管 2 中并充分混匀；从管 2 中取 150ul 转移到管 3 中并充分混匀；以此类推，从管 9 中取 150ul 转移到管 10 中并充分混匀，管 11 加入 150ul 样本稀释液作为零值校准品。

样本准备

不同的样本需要根据具体情况选择合适的稀释倍数，稀释样本请使用试剂盒内的样本稀释液。

1. 细胞上清：由于细胞上清样本因实验条件不同，呈现较大的差异，故细胞上清样本建议进行预测试来决定合适的稀释倍数，样本稀释请使用标准品/样本稀释液 (R1) 或是 PBS；
2. 血清/血浆：建议进行预测试来决定合适的稀释倍数，样本稀释请使用样本稀释液或是 PBS；

实验步骤

为获得理想的实验结果，请注意，在用完一种试剂后将剩下的组分立即放入 2-8℃度，防止长菌。

1. 准备好试剂盒，将待检测样本按要求处理，将 20×浓缩洗涤液按照使用需要量用去离子纯化水稀释 20 倍备用。
2. 分别再反应板上依次加入：各梯度校准品 50ul/孔或稀释后的样本 50ul/孔（样本稀释液 25ul/孔+样本 25ul/孔），加入微球混悬液（取前充分混匀）5ul/孔，贴上封板模，充分混匀，置于恒温孵育器上 1200rpm，37℃避光温育 60min。取出反应板，置于磁力板上，磁吸 2min，撕开封板模，保持反应板贴合磁力板，倾去上清，并用吸水纸吸去残留液体。
3. 按照 100ul/孔加入洗液，置于恒温孵育器上 1200rpm，震荡 1min，置于磁力板上磁吸 2min，倾去上清，并用吸水纸吸去残留液体。
4. 在反应板孔内，按照 50ul/孔加入检测抗体溶液，贴上封板模，置于恒温孵育器上 1200rpm，37℃避光温育 30min。取出反应板，置于磁力板上，磁吸 2min，倾去上清，并用吸水纸吸去残留液体。
5. 重复步骤 3 一次。
6. 在反应板孔内，按照 50ul/孔加入荧光素溶液，贴上封板膜，置于恒温孵育器上 1200rpm，37℃避光温育 15min。取出反应板，置于磁力板上，磁吸 3min，倾去上清，并用吸水纸吸去残留液体。
7. 重复步骤 3 一次。
8. 将反应板从磁力板上取下，加入 70ul/孔洗液，充分混匀后选择适当容器上机检测。
(上机操作请参阅仪器使用说明书)

简要实验流程

准备好需要的标准品和试剂



每孔加入 50μL 标准品或测试样本



每孔加入 5μL 编码微球

37°C孵育 1 小时，然后洗涤 1 次



添加 50μL 工作检测抗体

37°C孵育 0.5 小时，洗 1 次



添加 50μL SA-PE

37°C避光孵育 15 分钟



添加 50μL 洗涤缓冲液



使用仪器检测

结果计算

1. 使用测试获得的浓度值绘制标准曲线，推荐使用五参数拟合，具体也可根据需求选择其他拟合方式来绘制标准曲线。使用计算机软件以校准品荧光值为纵坐标（Y），校准品浓度为横坐标（X），绘制标准曲线。根据标准曲线盒稀释样本的荧光值分别计算稀释样本中分析物的浓度。
2. 如果样本在上样检测时进行了稀释，那么计算获得浓度需要乘以相应的稀释倍数。

灵敏度

最低检测 IL-10 可达 2 pg / mL、IL-6 可达 2 pg / mL、IL-2 可达 2 pg / mL、IFN- γ 可达 8 pg / mL、IL-4 可达 3 pg / mL、TNF- α 可达 8 pg / mL、IL-17A 可达 2 pg / mL。

特异性

本试剂盒不与以下物质发生交叉反应。

IL-1 β	10000 pg / mL
IL-5	10000 pg / mL
IL-8	10000 pg / mL
IL-12P70	10000 pg / mL
IFN- α	10000 pg / mL

精密度

批内差 CV<15%。

批间差 CV<15%。

回收率

将已知浓度的 IL-10、IL-6、IL-2、IFN- γ 、IL-4、TNF- α 、IL-17A 加入到血清基质中，其回收率在 85%-115%之间。

线性

Name	Bead	Standard curve
IL-10	12	7-3000 pg/ml
IL-6	14	3-1500 pg/ml
IL-2	15	5-2500 pg/ml
IFN- γ	21	10-2000 pg/ml
IL-4	22	5-1000 pg/ml
TNF- α	31	10-2500 pg/ml
IL-17A	33	2-1000 pg/ml

*For research purposes only. Not for therapeutic or diagnostic purposes.