

SpeedyPLEX 人/非人灵长类 Th1/Th2 细胞因子（6 因子）CBA 检测试剂盒 Panel

请在实验前仔细阅读本说明书

产品货号：KMF00005

样本类型：血清、血浆及细胞培养上清液

检测数目：96 次测试

靶标名称	标曲范围 (pg/mL)
IL-2	1.37-1000
IL-4	2.74-2000
IL-5	2.74-2000
IL-6	2.74-2000
TNF-alpha	2.74-2000
IFN-gamma	2.74-2000

本产品仅供研究用途，不得用于人类或动物的治疗或诊断。

目录页

1. 背景信息	3
2. 检测原理	4
3. 所需材料	4
4. 试剂盒组分及储存	5
5. 安全注意事项	5
6. 样本准备	6
7. 试剂制备	6
7.1 洗涤缓冲液 (1×)	6
7.2 抗体混合液 (1×)	6
7.3 样品稀释	6
7.4 链霉亲和素-PE (1×)	6
7.5 标准曲线	7
8. 实验步骤	8
9. 仪器设置与数据分析	10
9.1 仪器启动	10
9.2 创建数据采集新模板	10
9.3 设置密度图	10
9.4 设置 PMT 电压与门控	10
9.5 样本采集使用预存模板	12
9.6 数据导出与分析:	12
10. 实验参数	14
10.1 标准曲线	14
10.2 精密度	14
10.3 回收率	15
10.4 样本值	15
10.5 灵敏度	17
10.6 线性	18
10.7 特异性	19
11. 参考文献	21

1. 背景信息

白细胞介素 2 (IL-2) 是一种四螺旋束, I 型细胞因子, 可作为多种白细胞的生长因子。在免疫系统中, IL-2 对免疫稳态、正常的 T 调节细胞功能 and 自我耐受至关重要。它调节免疫细胞稳态, 并已被用于治疗一系列疾病, 包括癌症和自身免疫性疾病。IL-2 信号通过 IL-2R β 和 IL-2R γ 受体亚基的异二聚化。

白细胞介素-4 (IL-4) 属于 α 螺旋型细胞因子家族, 由活化的 CD4+T 细胞、嗜碱性粒细胞和肥大细胞产生。该因子可促进抗原呈递细胞的增殖与分化。该细胞因子已被应用于治疗多发性骨髓瘤、癌症、银屑病及关节炎等自身免疫性疾病。

白细胞介素-5 受体亚基 α (IL-5RA) 又称 CD125, 是一种 I 型跨膜蛋白, 属于 I 型细胞因子受体家族。IL-5RA 是高亲和力 IL-5 受体复合物 IL-5R 的重要组成部分, 该复合物由专门与 IL-5 结合的 α 链(IL-5RA)、IL-3 和 GM-CSF 受体共有的 β 链 (CD131) 组成。IL-5/IL-5RA 信号轴对嗜酸性粒细胞的分化、增殖、招募和活化至关重要, 也与病理性嗜酸性粒细胞的增多有关。

白介素-6 (Interleukin-6, IL-6) 是具有多种生物活性的细胞因子, 可由多种细胞类型在感染、创伤和免疫应激过程中产生。IL-6 通过由两种不同的膜结合糖蛋白组成的受体复合物起作用, 包括一个 80 kDa 的 IL-6 结合亚基 (IL-6R, CD126, gp80) 和一个 130 kDa 的信号转导元件 (gp130, CD130)。IL-6 与膜上的 IL-6R 结合后的复合物与 gp130 结合, 从而激活受体。gp130 在几乎所有器官中都有表达, 而 IL-6R 的表达主要局限于肝细胞和白细胞亚群 (单核细胞、中性粒细胞、T 细胞和 B 细胞)。除膜结合 IL-6R 外, 在人的血清和尿液中发现了可溶性 IL-6R。

TNF, 又称 TNF- α , 是一种具有多种功能的促炎性细胞因子, 属于肿瘤坏死因子 (TNF) 超家族。它主要由活化的巨噬细胞产生, 但也可以由许多其他细胞类型 (如 CD4+ 淋巴细胞、NK 细胞、中性粒细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞和神经元) 产生。这种细胞因子参与了多种生物过程的调节, 包括细胞增殖、分化、凋亡、脂质代谢和凝血。

干扰素- γ (Interferon gamma, IFN- γ) 是一种可溶性细胞因子, 是 II 型干扰素的唯一成员。它由 Th1 细胞、细胞毒性 T 细胞和 NK 细胞分泌。该细胞因子与抗病毒、免疫调节和抗肿瘤特性有关, 是巨噬细胞的一种有效激活剂。IFN- γ 在病原体清除中发挥至关重要的作用。其异常表达与许多自身炎症和自身免疫性疾病相关。在许多研究中, IFN- γ 已被确定为结核性胸膜炎的生物标志物。

2. 检测原理

免疫检测原理：检测前，荧光染料编码的微球已与捕获抗体偶联；样本孵育过程中，捕获抗体与相应的生物素化检测抗体均与靶标特异性结合，进而形成夹心复合物。随后加入链霉亲和素 - 藻红蛋白（PE），通过流式细胞术实现靶蛋白浓度的检测。

荧光信号检测：该检测方法中，流式细胞仪通过分析 APC 与 APC-Cy7 的荧光信号识别不同靶标，并基于 PE 荧光信号对靶标浓度进行定量分析。实验中使用的微球含有两种荧光染料（APC 与 APC-Cy7），按特定比例混合以形成独特的荧光编码序列。流式细胞仪通过分析编码微球的荧光团比例来区分不同靶标，每个靶标对应具有特定 APC 与 APC-Cy7 荧光团比例的编码微球类型。随后通过将各微球群体的 PE 荧光强度与标准曲线进行比对，即可确定目标蛋白的浓度。

3. 所需材料

3.1 配备双激光器的流式细胞仪（488 nm 或 532 nm 激发波长用于 PE，635 nm 激发波长用于 APC 及 APC-Cy7）。

示例：

Flow cytometer	Reporter channel	Bead channels
Beckman (CytoFlexs)	PE	APC/APC-Cy7
Challenbio(Fongcyte)	PE	APC/APC-Cy7
Agilent (Novocyte)	PE	APC/APC-Cy7

3.2 高精度移液器及一次性移液器枪头。

3.3 手持式磁性微孔板或带有磁性的微孔板清洗器用于 96 孔平底板的洗涤或者离心机用于 96 孔 V 底板的洗涤。

3.4 吸水纸巾。

3.5 用于制备标准品及样品稀释液的玻璃或塑料管。

3.6 烧杯与量筒。

3.7 对数坐标或半对数坐标绘图纸，或用于数据分析的计算机及软件。建议采用四参数逻辑回归（4-PL）分析方法。Proteintech 数据分析网站 <https://www.ptgcn.com/products/elisa-kits/>

3.8 微孔板恒温振荡器

3.9 超纯水或蒸馏水。

4. 试剂盒组分及储存

英文名称	中文名称	规格	数量	储存条件
Microplate - 96-Well Plate (Flat bottom) ¹	微孔板 - 96 孔平底板	8 孔×12 条	1 块	将所有试剂保存在 2 - 8 °C 的环境中，保存期限为 12 个月。请每次实验使用新的标准品。
Microplate - 96-Well Plate (V-bottom) ²	微孔板 - 96 孔 V 底板	8 孔×12 条	1 块	
Setup Beads Cocktail*	仪器设置混合磁珠*	500 µL / 瓶	1 瓶	
PE Control Beads*	PE 质控磁珠*	500 µL / 瓶	1 瓶	
Protein Standard Cocktail; lyophilized	标准品混合液 - 冻干粉状 *	详见 7.5	2 瓶	
Capture Beads Cocktail (50x)*	捕获磁珠混合液 (50x) *	120 µL / 瓶	1 瓶	
Biotinylated Detection Antibody Cocktail (50x)*	生物素化检测抗体混合液 (50x) *	120 µL / 瓶	1 瓶	
Sample Diluent PT 3-ef	样品稀释液 PT 3-ef	30 mL / 瓶	1 瓶	
Detection Diluent	检测试剂稀释液	30 mL / 瓶	1 瓶	
Additional Diluent ATK00005	干扰抑制剂 ATK00005 (仅用于血清和血浆样本)	6 mL / 瓶	1 瓶	
Wash Buffer Concentrate (20x)	洗涤缓冲液浓缩液 (20x)	30 mL / 瓶	1 瓶	
Streptavidin-PE (50x)*	链霉亲和素-PE (50x) *	120 µL / 瓶	1 瓶	
Plate Cover Seals	封板膜		4 张	

1: 微孔板 - 96 孔板 (平底)，洗涤步骤中可配合手持磁力板架或配备磁性平台的洗板机使用

2: 微孔板 - 96 孔板 (V 型底)，洗涤步骤中配合离心机使用

* 使用前立即离心

5. 安全注意事项

5.1 请勿在有效期后使用该试剂盒。

5.2 本试剂盒为整体使用单元，严禁混合不同批次或试剂盒中的组分进行实验。

5.3 实验过程中务必佩戴手套、口罩及护目镜等防护装备。

5.4 本产品仅限科学研究用途，不得用于人类或动物的治疗或诊断。

5.5 若样本测值超出标准曲线检测范围，应使用适当的稀释液对样本进行进一步稀释使样本测值落在标曲范围内后重新检测。

5.6 稀释液批次、实验操作人员、移液方式、洗涤技术、孵育时间或温度以及试剂盒使用过程的任何变化均可影响结合反应。

5.7 避免磁珠及链霉亲和素-PE (1x) 长时间曝光。

5.8 同一样本或重组蛋白的定量结果在 ELISA 和 CBA 两种检测方式中可能存在差异。

6. 样本准备

6.1 血清：全血标本室温凝固 30 min 后 1000 × g 离心 15 min，取上清立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融。

6.2 血浆：可用 EDTA 或肝素作为抗凝剂，标本采集后后 1000 × g 离心 15 min，立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融。(注意：标本溶血会影响检测结果，因此溶血标本不宜进行检测)。

6.3 细胞上清：收集细胞培养液，500 × g 离心 5 min 取上清，立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融。

7. 试剂制备

7.1 洗涤缓冲液 (1×)：若浓缩液中已形成晶体，将其加热至室温并轻柔搅拌直至晶体完全溶解。混合 570 mL 去离子水或蒸馏水与 30 mL 洗涤缓冲液浓缩液(20×)，制备 1×洗涤缓冲液。

7.2 抗体混合液 (1×)：捕获磁珠混合液与生物素标记检测抗体混合液均以 50×浓缩液形式提供并单独包装。使用前需将这两种组分混合至同一试管中，稀释至 1×工作浓度后使用。

7.2.1 在打开盖子前，用涡旋混合器重悬捕获磁珠混合液与生物素标记检测混合液。

7.2.2 在检测前，取对应体积的捕获磁珠混合液 (50×) 与生物素化标记检测抗体混合液 (50×) 至同一管抗体稀释液中配成抗体混合液 (1×)。

示例：

总体积 (μL)	捕获磁珠混合液 (50×) (μL)	生物素化检测抗体混合液 (50×) (μL)	检测稀释液 (μL)
1000	20	20	960
2500	50	50	2400
5000	100	100	4800

轻轻混合均匀后使用。根据实际使用情况灵活调整抗体混合液 (1×) 的总体积。在计算总体积时，应比实际使用体积多配置 100 μL 或 200 μL，以补偿实验过程中的损耗。

7.3 样品稀释：不同样品应使用相应的样品稀释液进行稀释。

7.3.1 若读数高于标准曲线最高检测值，则需要对样本进行进一步稀释。因此，建议通过预实验确定样本的稀释倍数。

7.3.2 样本采集、处理及储存过程中的变异可能影响测量结果。对于细胞培养上清液样本而言，其样本数值会受到多种因素的影响，包括培养条件、刺激浓度、刺激方法以及细胞批次等。

7.3.3 不同样本类型推荐稀释比例：人/食蟹猴血清和血浆样本推荐 1:2 稀释，人细胞上清推荐 1:2 至 1:512 稀释，食蟹猴细胞上清推荐 1:2 至 1:256 稀释。注：推荐稀释倍数仅供参考，实际稀释倍数应根据实际检测样本值确定。

7.4 链霉亲和素-PE (1×)：链霉亲和素-PE 以 50×浓缩液形式提供，使用前需进行稀释。

示例：

总体积 (μL)	链霉亲和素-PE (50×) (μL)	检测稀释液(μL)
1000	20	980

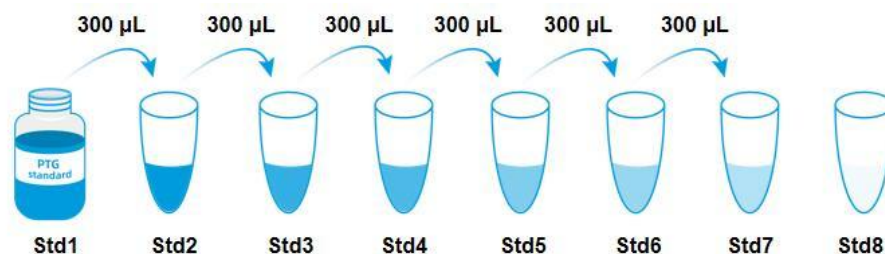
2500	50	2450
5000	100	4900

轻轻混合均匀后使用。根据测试孔位灵活调整抗体混合液（1×）的总体积。在计算总体积时，应比实际使用体积多配置 100 μL 或 200 μL，以补偿实验过程中的损耗。

7.5 标准曲线：

1. 取 7 个试管进行编号标记：Std2、Std3、Std4、Std5、Std6、Std7 及 Std8。
2. 向标准品混合物（冻干粉状）中加入 2000 μL 样品稀释液，命名为 Std1。
3. 向 Std2-Std8 试管中加入 600 μL 样品稀释液。
4. 使用新移液枪头将 300 μL 混合标准品从 Std1 管转移至 Std2 管。
5. 通过上下吸打 10 次进行混匀。
6. 对于 Std2 至 Std7 试管重复步骤 4-5，在每次稀释步骤之间更换移液枪头。
7. Std8 作为背景孔仅含有样本稀释液。

注：每次检测均需制备新的标准曲线。



	Std1	Std2	Std3	Std4	Std5	Std6	Std7	Std8
# 样品稀释剂 PT 3-ef (μL)	2000	600	600	600	600	600	600	600
上一梯度的标准品 (μL)	—	300	300	300	300	300	300	—
IL-2	1000	333.33	111.11	37.04	12.35	4.12	1.37	0
IL-4	2000	666.67	222.22	74.07	24.69	8.23	2.74	0
IL-5	2000	666.67	222.22	74.07	24.69	8.23	2.74	0
IL-6	2000	666.67	222.22	74.07	24.69	8.23	2.74	0
TNF-alpha	2000	666.67	222.22	74.07	24.69	8.23	2.74	0
IFN-gamma	2000	666.67	222.22	74.07	24.69	8.23	2.74	0

8. 实验步骤

注：

- 1) 避免磁珠及链霉亲和素-PE 长时间曝光。
- 2) 确保所有磁珠在整个实验步骤中均保持在培养板孔内，特别是在洗涤步骤中。
- 3) 本实验提供两种洗涤方法，可根据现有设备选择其中一种洗涤方法。
- 4) 微孔板 - 96 孔板（平底型）需与手持式微孔板磁铁或带磁性平台的洗板机配套使用（清洗步骤）；微孔板 - 96 孔板（V 型底板）需与离心机配套使用（清洗步骤）。

8.1 预设微孔板布局，包括零孔、标准品孔、待测样本孔。

对于血清或血浆样本，零孔、标准品孔以及待测样本孔预先加入 25 μL /孔干扰抑制剂溶液，不需要孵育和洗涤；

对于细胞上清样本，不需要加入干扰抑制剂，可直接进行下一步；

8.2 零孔加样本稀释液 50 μL ，余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本 50 μL /孔。

8.3 使用涡旋仪重悬抗体混合液（1 $\times$ ）（参见试剂配制 7.2），每孔加入 50 μL 溶液。盖上封板膜，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 微孔板恒温振荡器上（转速 800 rpm）孵育 1 小时。（注：磁珠为含铁塑料磁珠，在静置条件下会沉降于管底。因此每次加样前请重悬溶液，确保磁珠在液体中均匀分布）

8.4 洗涤（根据现有设备选择一种洗涤方法）

方法 1：使用 96 孔平底板时，请遵循以下洗涤步骤；

1) 将微孔板置于手持式磁性微孔板上静置 2 分钟，使磁珠通过磁力作用牢固附着于板底，随后通过抽吸或倾倒方式弃去孔内液体，同时保留孔内磁珠。注意：此步骤中需确保微孔板与磁性微孔板保持紧密贴合状态。

2) 将培养板从微孔板磁力架中取出，每孔加入 100 μL 1 $\times$ 洗涤液。用封板膜封板后，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 微孔板恒温振荡器上（转速 800 rpm）振荡 1 分钟。

3) 将微孔板置于手持式磁性微孔板上静置 2 分钟，使磁珠通过磁力作用牢固附着于板底，随后通过抽吸或倾倒方式弃去孔内液体，同时保留孔内磁珠。注意：此步骤中需确保微孔板与磁性微孔板保持紧密贴合状态。

方法 2：使用 96 孔 V 底板时，请按以下步骤洗涤；以 200 $\times g$ 离心力离心 5 分钟。轻柔移除封板膜。通过抽吸或倾倒方式弃去孔内液体。每孔加入 100 μL 1 $\times$ 洗涤缓冲液，盖上封板膜，置于恒温振荡器中 800 rpm 振荡 1 分钟后。将 V 底板以 200 $\times g$ 离心力离心 5 分钟。轻柔移除封板膜。通过抽吸或倾倒方式弃去孔内液体。

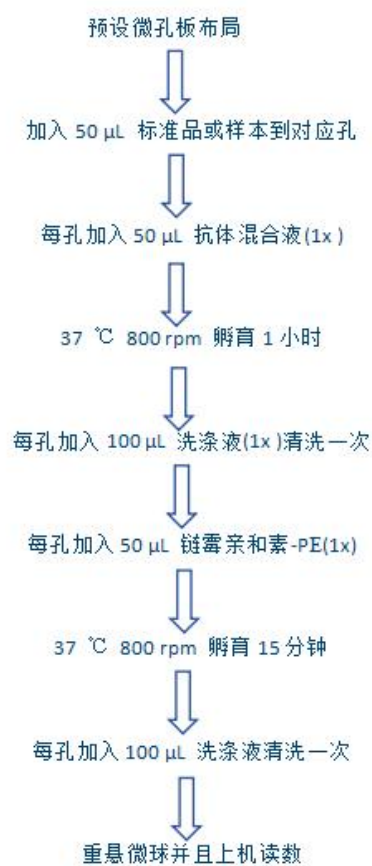
8.5 取出微孔板，向反应孔中加入 50 μL 链霉亲和素-PE（1 $\times$ ）溶液（参见试剂制备 7.4），置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 微孔板恒温振荡器上 800 rpm 孵育 15 分钟。

8.6 重复步骤 8.4。

8.7 加入 120 μL 1 $\times$ 洗涤液重悬磁珠。

8.8 在流式细胞仪上读取样本数据，并从软件中采集数据。

操作流程如下：



9. 仪器设置与数据分析

注意：

1) 本实验以安捷伦仪器（版本：Novocyte / 软件：Novoexpress）为例说明设置步骤。若使用其他仪器，遵循相同原则。

2) 若所使用的仪器软件能够同时执行数据读取与分析功能，建议遵循仪器操作规程进行数据设置与读取。对于 Novocyte 流式细胞仪，PE 通道用于检测样本中靶点浓度，APC/APC-Cy7 通道用于磁珠分类。通常情况下，若按照下述设置程序正确配置仪器，则无需对这两个通道进行补偿。以下情况需进行程序设置：

- 您首次使用 SpeedyPLEX 人/非人灵长类 Th1/Th2 细胞因子（6 因子）CBA 检测试剂盒 Panel。
- 您所使用的试剂盒具有相同的货号，但来自不同批次。

9.1 仪器启动

参照不同流式细胞仪设备的操作手册，完成开机及质控流程。在进行后续步骤前，确保仪器处于良好状态。确认 PE、APC 及 APC-Cy7 的激发通道处于启用状态

9.2 创建数据采集新模板

若未找到可用模板，请按以下步骤新建模板。若已有模板，请跳过此设置流程，直接进入 9.5 样本采集使用预存模板。

9.3 设置密度图

1) 从 Novoexpress 软件主界面点击文件>>新建>>新建空白实验，随即弹出空白实验窗口。从培养板或试管中选择测试孔位，右键单击鼠标并选择“新建”。随后样本孔位信息（如 A1）将显示于右下角窗口中。

2) 从工具栏中点击点图图标，将显示以 FSC-H（前向散射）为 X 轴、SSC-H（侧向散射）为 Y 轴的点图（图 1）。FSC-H/SSC-H 点图用于“总球数”门控以区分目标球数与杂质。将 FSC-H 和 SSC-H 设置为线性模式。如需切换模式，请点击坐标轴，右键单击鼠标并选择属性选项。

3) 从“总球数”父级门控中生成 APC 与 APC-Cy7 散点图（图 2），不同比例 APC 与 APC-Cy7 含量的磁珠将分散于相应位置。所有图表均需采用对数坐标模式。如需更改坐标模式，请点击坐标轴，右键单击鼠标并选择属性选项。

4) 从“总球数”父门（图 3）中创建 PE 与 Count（球数）直方图。

5) 设置仪器每孔采样的体积 $\geq 70 \mu\text{L}$ ，建议每个靶标的球数 ≥ 200 个球/孔，以保证数据的准确性。

9.4 设置 PMT 电压与门控

9.4.1 将仪器设置混合微球管振荡 30 秒以使磁珠重新悬浮。

9.4.2 将流式细胞仪流速设置为低速，在仪器上读取混合微球 $120 \mu\text{L}$ 。在参数窗口左上角调整 FSC-H 和 SSC-H 的增益值，使所有磁珠群体均可见（图 1）。通过工具栏点击椭圆形门控（亦可使用其他图形门控），用鼠标将细胞群体拖动至点阵图中心。在设置过程中需频繁暂停并重启采集流程，以便调整参数后刷新磁珠群体数据。

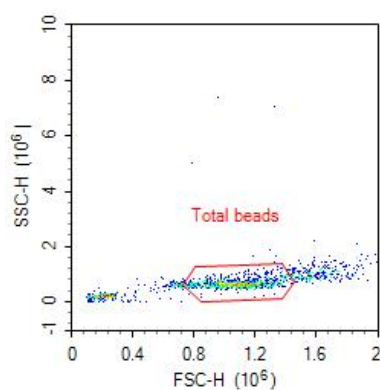


图 1

9.4.3 同时，调整参数窗口（左上角）中 APC 和 APC-Cy7 通道的增益值，确保所有磁珠在区域内均匀分布且彼此分离。若 APC 和 APC-Cy7 荧光信号超过图表的最大采集范围，需降低这两个通道的增益值；反之则需提高增益值。通过工具栏点击椭圆形门控（也可使用其他图形门控方式），用鼠标将细胞群拖拽至点阵图中心。对每个磁珠簇进行门控处理并标注靶标（见图 2）。

注：电压变化将导致磁珠整体位置发生偏移，但其彼此间的相对位置将保持不变。

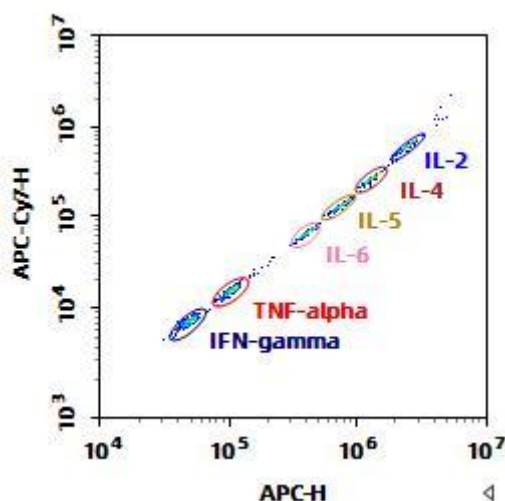


图 2

9.4.4 将 PE 质控磁珠管振荡 30 秒以使磁珠重新悬浮。在仪器上读取 PE 质控磁珠 120 μ L。

9.4.5 调整参数窗口（窗口左上角）中 PE 通道的增益值，使总磁珠的中位荧光强度（PE 通道）约为 $(1.5-5) \times 10^5$ （图 3）。**注：**PE 通道电压对获得最佳标准曲线至关重要。若电压设置过低，标准曲线低端可能趋于平台期，导致检测灵敏度降低；若电压设置过高，则标准曲线高端可能出现平台期。

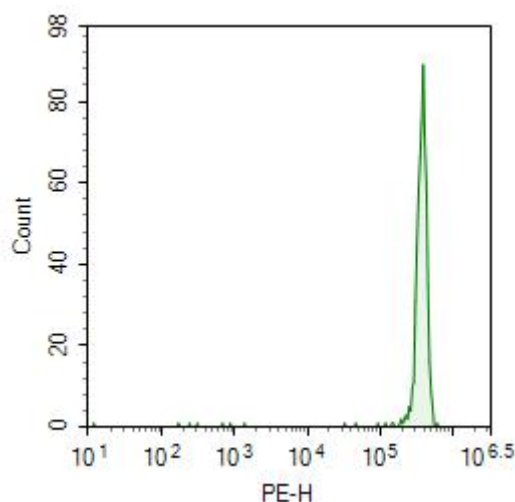


图 3

9.4.6 保存模板并重命名模板，随后进入设置流程的下一步骤。

9.5 样本采集使用预存模板

使用已有模板进行样本采集，请遵循以下操作说明。

9.5.1 从 Novoexpress 软件主界面，依次点击文件>>新建>>新建空白实验。

9.5.2 从培养板或试管中选择所有样本孔，右键单击鼠标并选择新建。随后所有样本孔信息（如：A1、A2、A3）将显示在右下角窗口中。

9.5.3 选择任意样本孔（如 A1），右键单击鼠标并依次选择导入>>导入模板>>选择对应模板>>确定。注：该模板仅适用于特定样本孔（如 A1）。

9.5.4 将样本孔拖动至标本处，从弹出窗口中选择“将模板粘贴至所有样本”。此时，该模板已应用于所有样本。

9.5.5 从窗口左下角点击运行板 >> 选择待运行孔位 >> 运行 >> 命名实验文件。

9.5.6 流式细胞仪现已准备就绪，可进行样本采集。

9.6 数据导出与分析：

9.6.1 所有测试孔数据采集完成后，从工具栏点击统计表格>>新建，随即弹出表格界面。可选择所需参数（包括磁珠球数及 PE 通道的 MFI），并导出表格，示例如下表。

孔位	靶标 1 球数	靶标 2 球数	靶标 3 球数	靶标 N 球数	靶标 1 PE-H	靶标 2 PE-H	靶标 3 PE-H	靶标 N PE-H
A1								
A2								
A3								
A4								
A5								
A6								

A7								
A8								
A9								
A10								
A11								
A12								
.....								

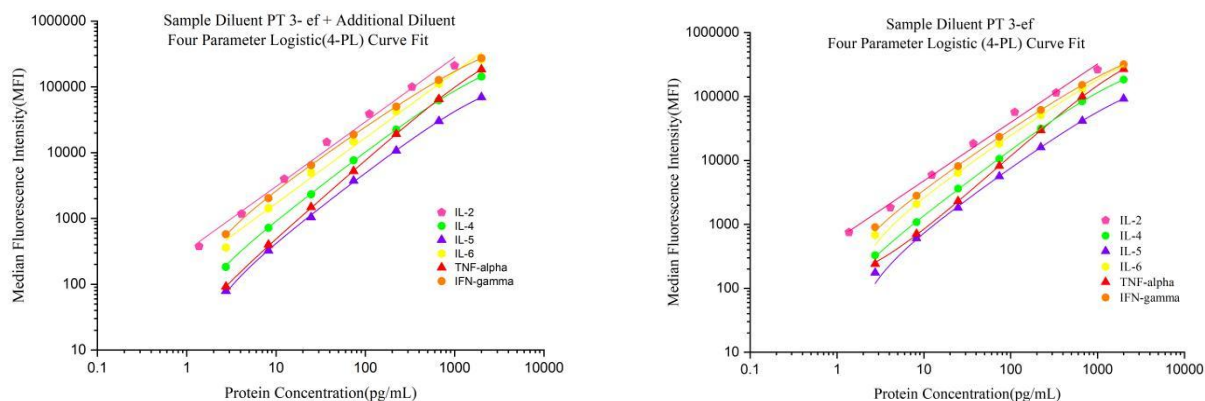
9.6.2 使用 Proteintech 网站列举的 VBA 分析工具，处理原始数据，链接如下：
https://www.ptgcn.com/static/VBA_Template.xlsm

9.6.3 计算各标准品与样品的平均 MFI 值，并减去零标准品的平均 MFI 值。采用四参数逻辑曲线拟合 (4-PL) 分析法分析，将各标准品的平均 MFI 值绘制在 y 轴、浓度值绘制在 x 轴上构建标准曲线。若样品经稀释处理，则需将浓度值乘以稀释倍数。

10. 实验参数

10.1 标准曲线

此标准曲线仅用于示例说明。每次检测应由实际检测值生成相应的标准曲线。



10.2 精密度

板内精密度：3 个不同浓度梯度的样本在同 1 次实验中重复测定 8 次；

板间精密度：3 个不同浓度梯度的样本在 4 次不同实验中重复测定 4 次。

靶标	样品	板内精密度 (n=8)			板间精密度 (n=16)		
		平均值 (pg/mL)	标准差	变异系数 (%)	平均值 (pg/mL)	标准差	变异系数 (%)
IL-2	样本 1	334.4	4.1	1.2	334.6	4.4	1.3
	样本 2	35.9	1.0	2.9	35.6	0.3	0.9
	样本 3	2.4	0.1	2.1	2.5	0.1	2.8
IL-4	样本 1	700.6	6.6	0.9	690.3	6.2	0.9
	样本 2	69.7	5.6	8.1	67.3	1.4	2.1
	样本 3	4.6	0.2	5.3	5.1	0.4	7.0
IL-5	样本 1	685.5	8.1	1.2	680.1	9.3	1.4
	样本 2	63.5	1.2	1.8	65.3	1.8	2.8
	样本 3	4.4	0.2	3.6	4.9	0.4	7.6
IL-6	样本 1	693.6	9.0	1.3	679.2	12.4	1.8
	样本 2	66.8	0.7	1.1	66.6	1.3	1.9
	样本 3	4.8	0.2	3.4	5.0	0.2	4.2
TNF -alpha	样本 1	722.0	5.5	0.8	707.2	12.2	1.7
	样本 2	56.3	0.5	0.8	58.3	1.5	2.7
	样本 3	4.2	0.2	5.0	5.0	0.5	10.6

靶标	样品	板内精密性 (n=8)			板间精密性 (n=16)		
		平均值 (pg/mL)	标准差	变异系数 (%)	平均值 (pg/mL)	标准差	变异系数 (%)
IFN-gamma	样本 1	683.3	5.0	0.7	675.3	9.1	1.3
	样本 2	70.8	0.9	1.3	69.4	1.2	1.7
	样本 3	4.7	0.1	1.8	4.8	0.1	3.1

10.3 回收率

血清及细胞上清样本使用样本稀释剂进行两倍预稀释后，在标曲范围内选择高、中、低 3 个浓度，进行加标回收率实验，结果如下：

靶标	人血清		人细胞上清	
	均值 (%)	范围 (%)	均值 (%)	范围 (%)
IL-2	105	95-119	105	95-119
IL-4	95	81-113	95	81-113
IL-5	85	72-99	85	72-99
IL-6	98	80-115	98	80-115
TNF -alpha	114	99-130	114	99-130
IFN-gamma	100	83-118	100	83-118

靶标	食蟹猴血清		食蟹猴细胞上清	
	均值 (%)	范围 (%)	均值 (%)	范围 (%)
IL-2	102	91-117	100	81-126
IL-4	94	74-107	88	73-106
IL-5	93	77-106	94	73-110
IL-6	82	74-91	89	70-107
TNF -alpha	90	81-107	101	73-134
IFN-gamma	104	96-117	98	81-120

10.4 样本值

人血清 - 应用本试剂盒，检测 12 例人血清样本中 IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、TNF - alpha 及 IFN-gamma 的浓度。

靶标	范围 (pg/mL)	可检出的数量(N)	平均值 (pg/mL)	检出率%
----	------------	-----------	-------------	------

靶标	范围 (pg/mL)	可检出的数量(N)	平均值 (pg/mL)	检出率%
IL-2	ND	0	ND	0%
IL-4	ND	0	ND	0%
IL-5	ND-11.41	8	2.18	67%
IL-6	1.83-20.55	12	10.43	100%
TNF-alpha	1.66-5.93	12	3.73	100%
IFN-gamma	0.02-3.49	12	0.89	100%

ND*= 未检出

食蟹猴血清 - 应用本试剂盒, 检测 8 例食蟹猴血清样本中 IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、TNF - alpha 及 IFN-gamma 的浓度。

靶标	范围 (pg/mL)	可检出的数量(N)	平均值 (pg/mL)	检出率%
IL-2	0.03-16.24	8	2.1	100%
IL-4	ND	0	ND	0%
IL-5	ND-5.63	2	0.82	25%
IL-6	ND	0	ND	0%
TNF-alpha	ND-2.62	6	0.76	75%
IFN-gamma	3.34-15.45	10	9.71	100%

ND*= 未检出

细胞上清 - 人外周血单个核细胞 (PBMC) (1×10^6 个细胞/mL) 在添加了 10 % 胎牛血清、5 μ M β -巯基乙醇、2 mM L-谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 硫酸链霉素的 DMEM 中培养。细胞未经刺激或用 10 μ g/mL PHA 刺激培养 1 天。取细胞培养上清样本, 检测 IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、TNF - alpha 及 IFN-gamma 的浓度。

刺激条件	IL-2 (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IL-5 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	TNF-alpha (pg/mL)	IFN-gamma (pg/mL)
未刺激 (1天)	11.97	ND	4.58	6.84	13.10	9.21
刺激 (1天)	12140.19	274.62	323.14	14148.25	7270.43	29671.91

食蟹猴外周血单个核细胞 (PBMC) (1×10^6 个细胞/mL) 在添加了 10 % 胎牛血清、5 μ M β -巯基乙醇、2 mM L-谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 硫酸链霉素的 DMEM 中培养。细胞未经刺激或用 10 μ g/mL PHA 刺激培养 3 天。取细胞培养上清样本, 检测 IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、TNF - alpha 及 IFN-gamma 的浓度。

刺激条件	IL-2 (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IL-5 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	TNF-alpha (pg/mL)	IFN-gamma (pg/mL)
未刺激 (3天)	ND	ND	ND	534.5	102.9	ND
刺激 (3天)	14.5	39.1	83.8	14440.1	3102.3	10306.7

食蟹猴外周血单个核细胞 (PBMC) (1×10^6 个细胞/mL) 在添加了 10 % 胎牛血清、 $5 \mu\text{M}$ β -巯基乙醇、2 mM L-谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 硫酸链霉素的 DMEM 中培养。细胞未经刺激或用 50 ng/mL PHA 和 1 $\mu\text{g/mL}$ 钙离子霉素刺激培养 1 天。取细胞培养上清样本，检测 IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、TNF - alpha 及 IFN-gamma 的浓度。

刺激条件	IL-2 (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IL-5 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	TNF-alpha (pg/mL)	IFN-gamma (pg/mL)
未刺激 (1天)	ND	ND	ND	5394.9	1307.8	27.5
刺激 (1天)	55397.1	1340.7	764.0	7528.6	9897.4	289641.9

食蟹猴外周血单个核细胞 (PBMC) (1×10^6 个细胞/mL) 在添加了 10 % 胎牛血清、 $5 \mu\text{M}$ β -巯基乙醇、2 mM L-谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 硫酸链霉素的 DMEM 中培养。细胞未经刺激，或用 PHA 和 IL-2 刺激培养 8 天后用 PHA、PMA 以及 Ca^{2+} 刺激培养 1 天。取细胞培养上清样本，检测 IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、TNF - alpha 及 IFN-gamma 的浓度。

刺激条件	IL-2 (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IL-5 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	TNF-alpha (pg/mL)	IFN-gamma (pg/mL)
未刺激 (9天)	ND	ND	ND	3.9	2.4	ND
刺激 (9天)	101437.7	11.5	30.9	134.6	4519.9	39981.9

10.5 灵敏度

最低可检测浓度值：20 个重复零孔样本 PE 通道的荧光强度中位数 (MFI) 的平均值加上两倍标准差得到的 MFI 值带入标准曲线拟合出对应的浓度值。

靶标	灵敏度 (pg/mL)
IL-2	0.03
IL-4	0.08

靶标	灵敏度 (pg/mL)
IL-5	0.36
IL-6	0.10
TNF-alpha	0.35
IFN-gamma	0.02

10.6 线性

人血清加入高浓度的各靶标混合蛋白，梯度稀释后检测样本加标线性，线性数据如下：

		IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	TNF-alpha	IFN-gamma
1:2	均值 (%)	118	90	97	81	74	115
	范围 (%)	118-119	87-94	95-99	75-87	73-75	113-116
1:4	均值 (%)	120	103	107	105	78	124
	范围 (%)	120-121	100-105	107-107	104-107	76-80	124-124
1:8	均值 (%)	120	117	108	114	94	125
	范围 (%)	118-123	116-118	105-111	109-120	89-99	122-127
1:16	均值 (%)	111	110	104	123	89	120
	范围 (%)	104-119	104-115	103-105	115-132	84-94	116-123

食蟹猴血清加入高浓度的各靶标混合蛋白，梯度稀释后检测样本加标线性，线性数据如下：

		IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	TNF-alpha	IFN-gamma
1:2	均值 (%)	104	94	85	77	103	114
	范围 (%)	100-107	91-96	83-88	76-77	97-109	112-117
1:4	均值 (%)	121	119	113	104	98	127
	范围 (%)	118-125	119-119	109-118	99-108	98-99	126-127
1:8	均值 (%)	124	119	110	107	90	131
	范围 (%)	124-124	117-120	109-112	105-109	89-91	131-132
1:16	均值 (%)	117	111	97	107	87	122
	范围 (%)	112-121	104-118	96-99	105-109	83-91	117-128

人细胞上清用对应样本稀释液稀释样本，使稀释后的检测值处于标曲范围内，线性数据如下：

(细胞上清样本预稀释 16 倍用于 IL-2 检测，预稀释 2 倍用于 TNF-alpha 检测，预稀释 32 倍用于 IFN-gamma 靶标检测)

		IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	TNF-alpha	IFN-gamma
1:2	均值 (%)	100	100	100	100	100	100

	范围 (%)	-	-	-	-	-	-
1:4	均值 (%)	105	108	105	105	109	107
	范围 (%)	104-107	108-108	99-112	100-110	106-113	103-110
1:8	均值 (%)	116	109	104	97	106	111
	范围 (%)	115-117	107-111	96-112	86-109	101-111	104-118
1:16	均值 (%)	123	112	106	81	99	109
	范围 (%)	120-125	109-114	92-120	67-95	94-104	105-114

食蟹猴细胞上清用对应样本稀释液稀释样本，使稀释后的检测值处于标曲范围内，线性数据如下：

(细胞上清样本预稀释 4 倍用于 IFN-gamma 靶标检测)

		IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	TNF-alpha	IFN-gamma
1:2	均值 (%)	100	100	100	100	100	100
	范围 (%)	-	-	-	-	-	-
1:4	均值 (%)	103	99	96	102	111	99
	范围 (%)	98-108	94-104	90-102	99-104	109-113	98-101
1:8	均值 (%)	107	100	101	91	106	98
	范围 (%)	106-107	93-108	94-107	86-95	106-106	97-99
1:16	均值 (%)	109	96	90	78	92	99
	范围 (%)	109-109	91-100	85-95	72-84	91-93	98-101

10.7 特异性

在本试剂盒中，分别加入 50 ng/mL 以下分析物，无明显交叉反应。

IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	TNF-alpha	IFN-gamma
Human IL-1 alpha	Human GM-CSF	Human IL-3	Human CNTF	Human TNF-β	Human IFN-γ R1
Human IL-1 beta	Human gp130	Human IL-5 Ra	Human IL-12	Rat TNF-α	Human IFN-β
Human IL-2Ra	Human IL-4 R	Mouse IL-5	Human OSM	Mouse TNF-α	Mouse IFN-γ
Human IL-2 gamma chain	Mouse IL-4		Human IL-11	Human TNF RI	Rat IFN-γ
Human IL-4			Human G-CSF	Human TNF RII	
Human IL-7			Mouse IL-12	Human TNFSF13	
Human IL-9			Human gp130		
Human IL-15			Mouse IL-6		
Human IL-21					
Mouse IL-2					
Rat IL-2					

11. 参考文献

1. Scheller J. et al. (1988). Behring Inst Mitt. (83):40-7.
2. Heinrich PC. et al. (2003). Biochem J. 374: 1-20.
3. Dinarello, Charles A. Annual review of immunology vol. 27 (2009): 519-50.
4. Dinarello, C A. International reviews of immunology vol. 16,5-6 (1998): 457-99.
5. Scheller J. et al. (1988). Behring Inst Mitt. Behring Inst Mitt. (83):40-7.
6. Heinrich PC. et al. (2003). Biochem J. 374: 1-20.7. K Takatsu. et al. (1988) Immunol Rev. 102:107-35.
7. Mosmann, T R. Advances in immunology vol. 56 (1994): 1-26.
8. Kühn, R et al. Cell vol. 75,2 (1993): 263-74.10. Rosenberg, Steven A. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) vol. 192,12 (2014): 5451-8.
9. Buchegger, F et al. International journal of cancer vol. 33,5 (1984): 643-9.
10. Zhao, Linshu et al. British journal of haematology vol. 125,5 (2004): 666-73.
11. Gray, P W, and D V Goeddel. Nature vol. 298,5877 (1982): 859-63.
12. Schoenborn, Jamie R, and Christopher B Wilson. Advances in immunology vol. 96 (2007): 41-101.