

**Add&Read Human IL2
Quantitative Detection Kit**

DD2705



使用说明书
Version 23.1

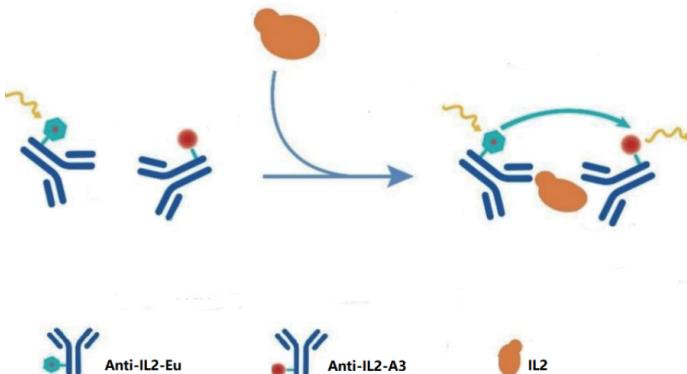
目录 Contents

01/产品概述	02
02/产品组分	02
03/保存条件及有效期	02
04/适用范围	03
05/自备材料	03
06/注意事项	03
07/实验流程	03
07-1/试剂配制	03
07-2/样品准备	04
07-3/反应体系	04
08/数据处理	05
09/产品性能指标	05
09-1/分析灵敏度	05
09-2/精密度	05
09-3/准确度	06
09-4/特异性	06
09-5/溯源	06

01/产品概述

白介素2(IL2)是一种主要由活化T细胞产生的免疫调节细胞因子，在体内主要起到促进T淋巴细胞和NK细胞的增殖，促进B细胞分化增殖，促进抗体生成等作用，在机体免疫应答、免疫调节和抗肿瘤免疫中具有重要作用。

本试剂盒采用夹心法检测IL2含量，试剂盒中有IL2 Standard以及两株特异性识别IL2的单克隆抗体，其中一株抗体偶联Eu(供体，Anti-IL2-Eu)，另一株抗体偶联A3(受体，Anti-IL2-A3)。当两株抗体同时与IL2结合时，Anti-IL2-Eu和Anti-IL2-A3距离靠近，可发生荧光共振能量转移(FRET)。使用320/340 nm的激发光激发荧光供体，供体发射620 nm的光，此620 nm的光激发荧光受体，受体发射出665 nm的光。样本中待测IL2浓度与FRET信号值(665 nm/620 nm的光强度比值)成正比。



02/产品组分

组分	DD2705-01(96 tests)	DD2705-02(500 tests)	DD2705-03(10,000 tests)
IL2 Standard	400 µl	2 × 400 µl	4 × 400 µl
Anti-IL2-Eu (20 ×)	12 µl	50 µl	1 ml
Anti-IL2-A3 (20 ×)	12 µl	50 µl	1 ml
Detection Buffer (ready-to-use)	500 µl	3 ml	50 ml
Diluent Buffer (ready-to-use)	2 × 1 ml	10 ml	100 ml
说明书	1册	1册	1册

03/保存条件及有效期

试剂盒于-30 ~ -15°C保存，≤0°C运输；避免强光直射，有效期12个月。

04/适用范围

细胞上清

05/自备材料

96/384-well low volume white plate

酶标仪(配置HTRF/TR-FRET模块)

06/注意事项

1. Anti-IL2-Eu (20 ×)与Anti-IL2-A3 (20 ×)建议在储存液条件下(20 ×)分装于-30 ~ -15℃保存，避免反复冻融，分装体积建议不低于10 μl。
2. IL2 Std建议在-85 ~ -65℃保存，避免反复冻融。
3. 若Detection Buffer和Diluent Buffer出现少许沉淀属于正常现象，可采用室温涡旋或37℃水浴溶解后正常使用，解冻的Detection Buffer和Diluent Buffer可在2 ~ 8℃保存。
4. 为了在第一次使用本试剂盒时检查您的检测缓冲液是否有潜在的干扰效应，我们建议使用您自己的培养基和稀释剂平行制备校准曲线。
5. 加样品时，避免产生气泡。

07/实验流程

07-1/试剂配制

1. Anti-IL2-Eu和Anti-IL2-A3工作液配制(储存液为20 ×)

96/384-well low volume white plate的反应体积为20 μl，建议每20 μl体系各加入2 μl Anti-IL2-Eu和2 μl Anti-IL2-A3的工作液。在配制之前计算所需的Anti-IL2-Eu(20×)和Anti-IL2-A3(20×)的体积： $V=(\text{制样孔数} \times 2)/20$ μl。

▲计算制样孔数时应将移液损失考虑进去，一般建议：制样孔数=实际检测孔数×110%

Anti-IL2-Eu工作液配制：

- 将Anti-IL2-Eu (20 ×)从冰箱中取出，室温放置使其溶解，充分混匀后使用。
- 取1体积的Anti-IL2-Eu (20 ×) (1V μl)，加入到19体积Detection Buffer中 (19V μl)，混合均匀，备用。

Anti-IL2-A3工作液配制：

- 将Anti-IL2-A3 (20 ×)从冰箱中取出，室温放置使其溶解，充分混匀后使用。
- 取1体积的Anti-IL2-A3 (20 ×) (1V μl)，加入到19体积Detection Buffer中 (19V μl)，混合均匀，备用。

▲Anti-IL2-Eu (20 ×)与Anti-IL2-A3 (20 ×)建议分装于-30 ~ -15℃保存，避免反复冻融。

2. Standard配制

96/384-well low volume white plate的反应体系为20 μl/孔，每一个孔需要Standard 16 μl，在配制之前计算所需的Standard体积。

- 将IL2 Standard从冰箱中取出恢复至室温并混匀，获得IL2 Std。
- 可参考下表进行Standard梯度稀释，以下表各梯度体积进行Diluent Buffer的分装。
- 取60 μl的IL2 Std，加入到120 μl Diluent Buffer中，混合均匀，获得Std 7。
- 取60 μl Std 7，加入到72 μl Diluent Buffer中，混合均匀，获得Std 6。
- 以同样方式2.2倍稀释，获得Std 5-Std 1。

Standard	稀释方式	Standard浓度 pg/ml
Std 7	60 μl IL2 Std + 120 μl Diluent Buffer	8000
Std 6	60 μl Std 7 + 72 μl Diluent Buffer	3636
Std 5	60 μl Std 6 + 72 μl Diluent Buffer	1653
Std 4	60 μl Std 5 + 72 μl Diluent Buffer	751
Std 3	60 μl Std 4 + 72 μl Diluent Buffer	342
Std 2	60 μl Std 3 + 72 μl Diluent Buffer	155
Std 1	60 μl Std 2 + 72 μl Diluent Buffer	71
Std 0	72 μl Diluent Buffer	0

▲ 混匀后的IL2 Std分装于-85 ~ -65℃保存，避免反复冻融。

07-2/样品准备

为降低样品基质带来的影响，推荐使用Diluent Buffer进行大于2倍的稀释度稀释样品，具体稀释度根据实际应用需求进行拟定。

▲ 若样品使用培养基稀释，则对应校准曲线也需用培养基配制。

07-3/反应体系

1.加样

96/384-well low volume white plate反应体积为20 μl，按照下表实验分组及反应体系进行样品加样。

Standard/样品	阴性对照
Standard/样品	-
Anti-IL2-Eu	2 μl
Anti-IL2-A3	2 μl
Diluent Buffer	-
Detection Buffer	-

2. 试剂添加顺序为：

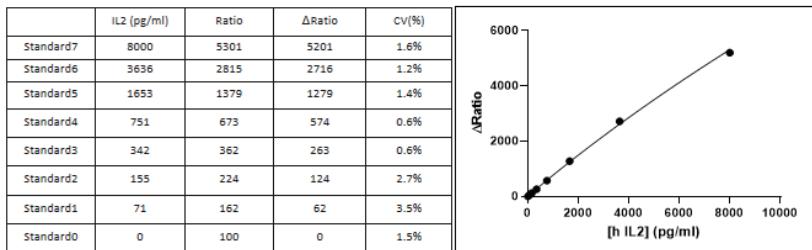
- 向96/384-well low volume white plate中加入16 μl Standard/样品。
- ▲ 建议标曲各点及样本设置三孔重复，以提高检测准确度。
- 将Anti-IL2-Eu工作液和Anti-IL2-A3工作液以体积1:1混合均匀后，向反应体系中加入4 μl，用移液器在加样孔内轻柔吹打五次混匀。
- 3. 室温或者25℃条件下，孵育2h，用酶标仪(配置HTRF/TR-FRET模块)检测，激发光为320/340 nm，检测两个波长(620 nm和665 nm)的发射光。

08/数据处理

- 将665 nm荧光值除以620 nm荧光值，把得到的值再乘以 10^4 ，获得Ratio值($665 / 620 * 10^4$)。
- 将各孔Ratio值减去Standard 0孔Ratio值，获得 Δ Ratio值。
- 以IL2浓度为横坐标， Δ Ratio值为纵坐标，进行4参数拟合(加权 $1/y^2$)。

▲ 添加 $1/y^2$ 对等式对数据进行加权，最终成为4PL $1/y^2$ 拟合。 $1/y^2$ 加权校正是考虑到随着信号的增加而发生的方差变化，加权后提高了校准曲线在低/高浓度的精度。
- 将样品的 Δ Ratio值代入校准曲线的拟合方程式，计算出样品浓度，乘以稀释倍数即为样品的实际浓度，若样本 Δ Ratio值超过校准曲线的 Δ Ratio值范围，需调整稀释倍数后再进行检测。此校准曲线仅用于示范，每次实验均应生成新的校准曲线。

09/产品性能指标



▲ 受不同实验室及酶标仪的差异影响，可能会出现不同实验室下检测结果的差异。

09-1/分析灵敏度

重复测定Standard 0 20次来确定检测限，重复测定21pg/ml 20次来确定定量限。

	Diluent	DMEM	RPMI
检测限(LOD)	5.64 pg/ml	24.74 pg/ml	6.81 pg/ml
定量限(LOQ)	37 pg/ml		

▲ 受不同实验室及酶标仪的差异影响，可能会出现不同实验室下检测结果的差异。

09-2/精密度

本试剂盒利用5个已知浓度的质控品在同一酶标板上重复测定3次，以评估分析内精密度。利用5个已知浓度的质控品由两名技术人员进行6个独立的分析批进行测定，以评估分析间精密度。

分析内精密度				
样品	n	测得平均浓度(pg/ml)	SD	CV
定量上限浓度样品	3	7565	298.04	3.94%
高浓度样品	3	6526	481.46	7.38%
中浓度样品	3	1234	38.06	3.08%
低浓度样品	3	210	3.36	1.60%
定量下限浓度样品	3	67	2.02	3.02%

分析间精密度				
样品	n	测得平均浓度(pg/ml)	SD	CV
定量上限浓度样品	6	7629	210.20	2.76%
高浓度样品	6	6288	424.62	6.75%
中浓度样品	6	1175	71.95	6.12%
低浓度样品	6	208	5.37	2.58%
定量下限浓度样品	6	71	5.05	7.16%

09-3/准确度

本试剂盒利用5个已知浓度的质控品在同一个酶标板上重复测定3次，以测定浓度与理论浓度比值来评估准确度。

样品	n	理论浓度(pg/ml)	测定浓度均值(pg/ml)	准确度% (80-120)
定量上限浓度样品	3	8000	7565	95
高浓度样品	3	6400	6526	102
中浓度样品	3	1200	1234	103
低浓度样品	3	200	210	105
定量下限浓度样品	3	71	67	95

09-4/特异性

本试剂盒可识别天然和重组的人IL2。对下面列出的因子进行特异性测定，未观察到明显的交叉反应。

人			
IL1 beta	IFN gamma	IL6	IL8
IL10	GM-CSF	TNF alpha	

09-5/溯源

NIBSC/WHO (86/500) approximate value (IU/mL) = 0.01 × Human IL2 value (pg/mL)。



Nanjing Vazyme Biotech Co.,Ltd.

Web: www.vazyme.com

Tel: +86-400-007-8058

Sales: sales@vazyme.com

Support: support@vazyme.com

