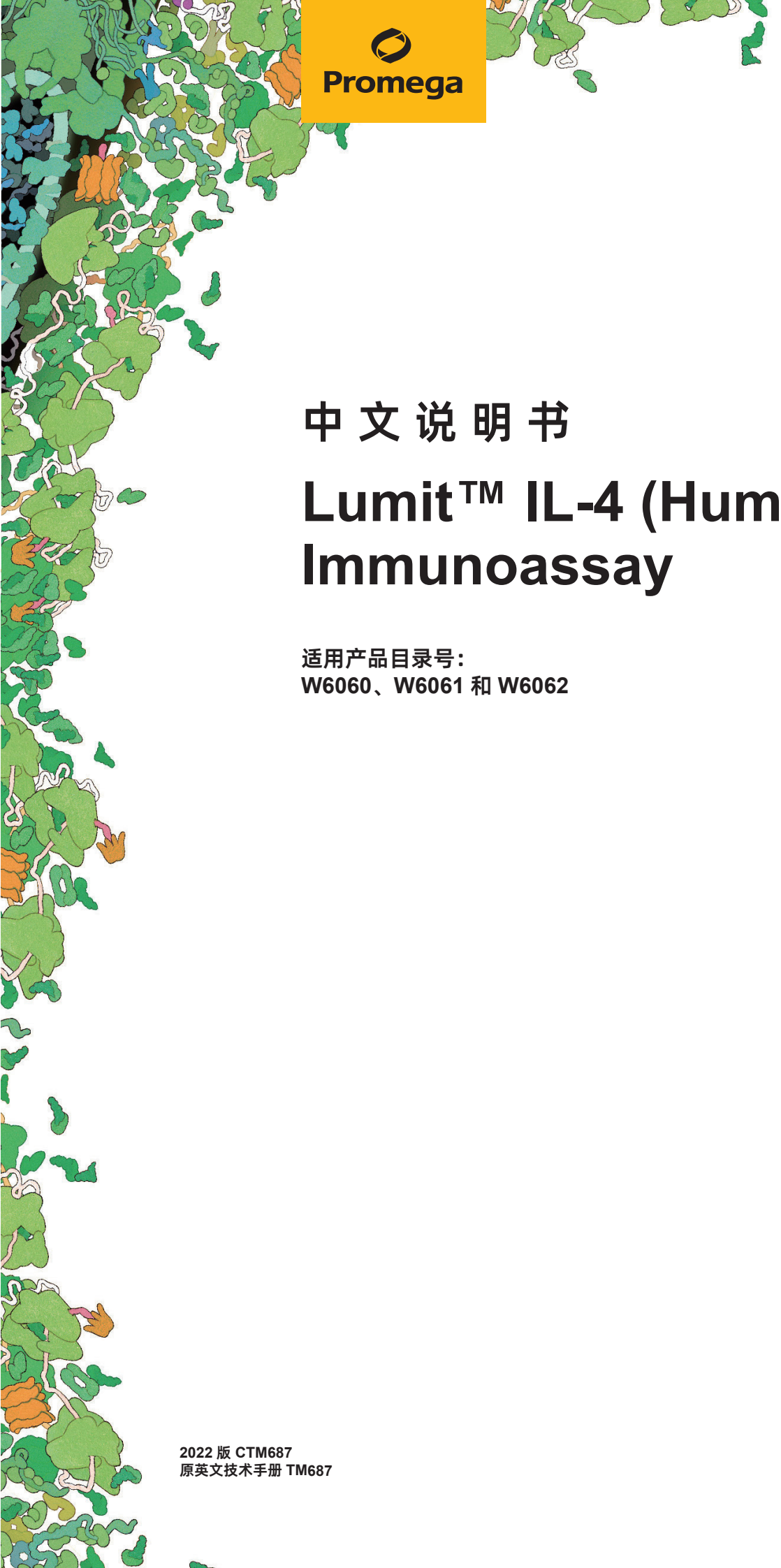


中 文 说 明 书

Lumit™ IL-4 (Human) Immunoassay

适用产品目录号：
W6060、W6061 和 W6062

2022 版 CTM687
原英文技术手册 TM687

Lumit™ IL-4 (Human) Immunoassay

所有技术文献的英文原版均可在 www.promega.com/ protocols 获得。请访问该网址以确定您使用的说明书是否为最新版本。如果您在使用该试剂盒时有任何问题，请与 Promega 北京技术服务部联系。
电子邮箱：chinatechserv@promega.com

1. 描述 2
2. 产品组分和储存条件 3
3. 开始实验前 4
4. 培养细胞的直接（无转移）方案 6
   - 4. A. 细胞铺板和处理 6
   - 4. B. 制备人 IL-4 标准品稀释液 7
   - 4. C. 添加 5X 抗 hIL-4 抗体混合物至检测孔 8
   - 4. D. 添加 Lumit™ 检测试剂 B 至检测孔 9
5. 可选样品转移方案 10
   - 5. A. 细胞铺板和处理 10
   - 5. B. 制备人 IL-4 标准品稀释液 11
   - 5. C. 添加 2X 抗 hIL-4 抗体混合物至检测孔 12
   - 5. D. 添加 Lumit™ 检测试剂 B 至检测孔 13
6. 结果计算 14
7. 代表数据 14
8. 疑难解答 16
9. 附录 17
   - 9. A. 评价 Lumit™ Cytokine Immunoassay 的交叉反应 17
   - 9. B. 使用 Lumit™ IL-4 (Human) Immunoassay 进行多重检测 18
   - 9. C. 参考文献 19
   - 9. D. 相关产品 19

CTM 687
2022 制作

1. 描述

Lumit™ IL-4 (Human) Immunoassay [a,b] 是可用于检测细胞释放白介素 -4（IL-4）的均质生物发光检测试剂盒，无需样品转移或洗涤。IL-4 这一重要免疫调节细胞因子由一系列免疫细胞，包括辅助型 T 细胞 2（Th2）细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞和肥大细胞）分泌，其参与抗体产生、造血、炎症和效应 T 细胞应答等过程（1）。IL-4 在哮喘和过敏性炎症（2）中起主要作用，且在癌症生物学中也起着更复杂的作用（3,4）。并可能与疾病治疗相关。据相关报道，IL-4 还具有免疫功能和高级大脑功能（包括记忆和学习）（5）。因此，测量细胞培养模型中 IL-4 生成量是基础研究和相关药物研发工作的重要组成部分。

Lumit™ IL-4 (Human) Immunoassay 适用于细胞培养样品。Lumit™ 试剂可直接分装至含细胞和培养基的微孔板孔中。或者，可将细胞孔中的培养基转移至其他孔板内进行分析。用户需自行确定检测其他类型样品的检测性能。

Lumit™ IL-4 (Human) Immunoassay 基于 NanoLuc® Binary Technology（NanoBiT®）。NanoBiT® 为发光的结构互补系统，用于生物分子相互作用研究（6,7）。此系统由两个亚基组成，大亚基 Large BiT（LgBiT；18kDa）和小亚基 BiT（SmBiT；11 个氨基酸肽）。LgBiT 亚基和 SmBiT 亚基已经过优化，拥有良好的稳定性和最小化的自联。在此试验中，会将样品与 SmBiT 或 LgBiT 共价标记 1 对抗人 IL-4 单克隆抗体一起孵育。当标记的抗体识别释放的 IL-4 并与之结合时，使得互补的 LgBiT 和 SmBiT 分子接近，从而重构 NanoBiT® 酶并在 Lumit™ 底物存在的情况下产生发光。产生的发光信号与样品中分析物量成正比。

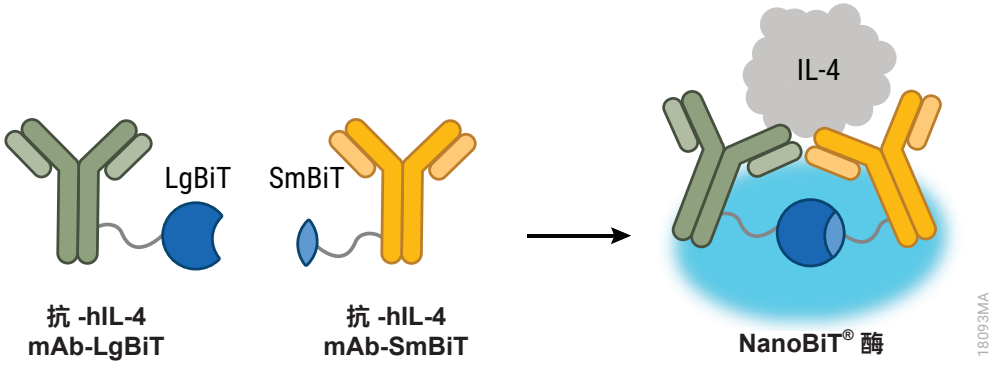


图 1. 检测原理。人 IL-4 单克隆一抗经 SmBiT 和 LgBiT 标记。当 IL-4 存在时，SmBiT 和 LgBiT 会彼此靠近，从而形成 NanoBiT® 酶。当添加 Lumit™ 检测试剂 B 时，可产生明亮的发光信号。

普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司 地址：北京市东城区北三环东路 36 号环球贸易中心 B 座 907-909 技术支持电话：400 810 8133
Promega (Beijing) Biotech Co., Ltd 电话：010-58256268 网址：www.promega.com 技术支持邮箱：chinatechserv@promega.com

CTM 687
2022 制作

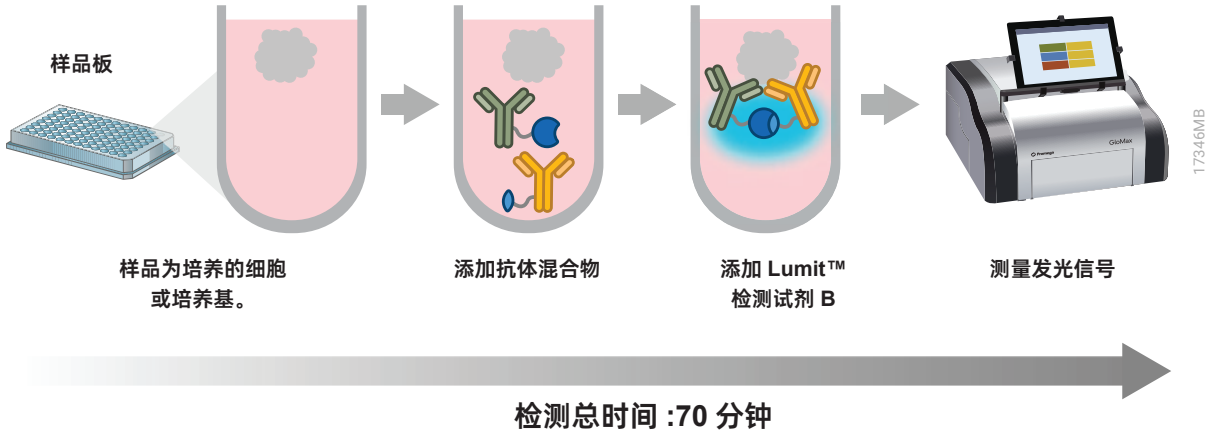


图 2. 检测方案。Lumit™ IL-4 (Human) Immunoassay 可直接应用于培养的细胞或培养基（从细胞培养板转移至新检测板）。Lumit™ Immunoassay 检测方案中不涉及洗涤步骤，且 70 分钟内便可完成检测。

2. 产品组分和储存条件

产品	规格	目录号
Lumit™ IL-4 (Human) Immunoassay	**100 assays**	**W6060**

使用 96 孔板时，可进行 100 次检测；可根据板规格调整体积。包括：

- 30µl 抗 hIL-4 mAb-SmBiT，500X
- 30µl 抗 hIL-4 mAb-LgBiT，500X
- 25µl 人 IL-4 标准品
- 160µl Lumit™ 检测底物 B
- 3.2ml Lumit™ 检测缓冲液 B

产品	规格	目录号
Lumit™ IL-4 (Human) Immunoassay	**1000 assays**	**W6061**

使用 96 孔板时，可进行 1000 次检测；可根据板规格调整体积。包括：

- 300µl 抗 hIL-4 mAb-SmBiT，500X
- 300µl 抗 hIL-4 mAb-LgBiT，500X
- 25µl 人 IL-4 标准品
- 1.25ml Lumit™ 检测底物 B
- 25ml Lumit™ 检测缓冲液 B

2. 产品组分和储存条件（续）

产品	规格	目录号
Lumit™ IL-4 (Human) Immunoassay	**5×100 assays**	**W6062**

使用 96 孔板时，可进行 500 次检测；可根据板规格调整体积。包括：

- 5×30µl 抗 hIL-4 mAb-SmBiT，500X
- 5×30µl 抗 hIL-4 mAb-LgBiT，500X
- 25µl 人 IL-4 标准品
- 5×160µl Lumit™ 检测底物 B
- 5×3.2ml Lumit™ 检测缓冲液 B

储存条件：接收后，将完整试剂盒置于低于 -65°C条件下储存。或者，将人 IL-4 标准品置于低于 -65°C条件下储存，其他组分置于 -30°C至 -10°C条件下储存。解冻后，应将人 IL-4 标准品置于 + 2°C至 + 10°C条件下储存（最长为 1 个月）。若解冻后人 IL-4 标准品的储存时间超 1 个月，则应进行分装，并置于低于 -65°C条件下储存。解冻后，将抗 hIL-4 mAb-SmBiT 和抗 hIL-4 mAb-LgBiT 置于 -30°C至 -10°C条件下储存。解冻后，将 Lumit™ 检测缓冲液 B 置于室温条件下储存。Lumit™ 检测底物 B 避光储存。

3. 开始实验前

共有两种人 IL-4 测量方案可供选择。一般来说，直接方案的灵敏度高于转移方案，且样品操作处理步骤更少。选择可选样品转移方案时，可在处理过程中同一孔内灵活采样和进行等分样品分析，从而实现同一样品中多种细胞因子水平的评价。

培养细胞的直接（无转移）方案（第 4 节）：直接测量细胞培养孔中的人 IL-4。取 20µl 5X 抗体混合物，加至 80µl 培养基（含细胞或 IL-4 标准品稀释液）中，并孵育 60 分钟。孵育后，加入 25µl Lumit™ 检测试剂 B 并记录发光信号。

可选样品转移方案（第 5 节）：测量培养基样品（取自处理后细胞孔）中人 IL-4。从细胞孔中取 50µl 培养基转移至新的检测板中。取 50µl 2X 抗体混合物至 50µl 转移的样品或标准品稀释液中，孵育 60 分钟。孵育后，加入 25µl Lumit™ 检测试剂 B 并记录发光信号。

说明：可根据样本量对检测体积进行扩展和调整。第 4 节和第 5 节所述方案列出了 96 孔和 384 孔板的常用体积。可使用其他体积，但应保证抗体和检测试剂最终浓度与推荐浓度一致。我们建议使用含 5~10% 胎牛血清（FBS）的标准组织培养基。较低浓度 FBS 可能导致背景（非分析物介导的抗体配对）升高和重复测量变异性增大。使用不含酚红的培养基可提高检测灵敏度和减少发光信号猝灭的内滤效应。

普洛麦格（北京）生物技术有限公司 地址：北京市东城区北三环东路 36 号环球贸易中心 B 座 907-909 技术支持电话：400 810 8133
Promega (Beijing) Biotech Co., Ltd 电话：010-58256268 网址：www.promega.com 技术支持邮箱：chinatechserv@promega.com

CTM 687
2022 制作

试剂制备和储存

临用当天，制备人 IL-4 标准品系列稀释液（第 4.B 节或第 5.B 节）、抗 hIL-4 抗体混合物（第 4.C 节或第 5.C 节）和 Lumit™ 检测试剂 B（第 4.C 节或第 5.C 节）。不可重复使用人 IL-4 标准品稀释液、抗 hIL-4 抗体混合物或 Lumit™ 检测试剂 B。

处理细胞和细胞培养试剂等生物危害性材料时，应穿戴个人防护设备并遵守就职机构的安全指南和处置要求。

检测板图

	IL-4 标准曲线（pg/ml）*		测试样品									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	25,000	25,000										
B	7,500	7,500										
C	2,250	2,250										
D	675	675										
E	203	203										
F	60.8	60.8										
G	18.2	18.2										
H	0	0										

*** 说明：** 上述人 IL-4 标准品系列稀释液浓度以及后续操作流程说明所述 IL-4 标准品系列稀释液浓度仅为推荐浓度。

用户需提供的材料

- 细胞（人源）
- 培养基（例如，RPMI 1640、GIBCO®，目录号：22400-089 + 10% 热灭活胎牛血清、GIBCO®，目录号：A3840001）
- 白色、组织培养多孔板（纯白色或白色、底部透明），与光度计兼容性良好（例如，Corning®96 孔板，目录号：3917）
- 多通道移液器或自动移液站
- 稀释管或多隔室稀释槽（例如，Dilux®D-1002）
- 试剂槽托盘（例如，Midwest Scientific，目录号：RR25）
- 多孔板混匀用板振荡器
- 可读取多孔孔板的光度计（例如，GloMax® Discover System，目录号：GM3000）

4. 培养细胞的直接（无转移）方案

此方案介绍了如何直接检测含细胞和培养基的检测孔中所释放的 IL-4。鉴于需进行定量，因此使用培养基对 IL-4 标准品进行稀释并建立标准曲线。

4.A. 细胞铺板和处理

1. 将细胞铺板至白色（或白色但底部透明）、96 或 384 孔组织培养板中。列 1 和列 2 不添加细胞。若使用的是贴壁细胞，则应使细胞贴壁。

   说明：虽然检测方法的动态范围较大且可灵活选择细胞数量，但还是应根据经验确定特定细胞模型每孔分装的最佳细胞数量。确保释放的最高水平细胞因子不超过检测方法的线性范围。在线性范围内，可增加细胞数量从而满足低水平细胞因子检测要求。参见图 5 和 6 中人 Th2 和 PBMC 所用细胞数量示例。

2. 取特定体积的测试化合物加至每一孔中，处理细胞，并使每孔总体积为：

   96 孔板：每孔 80µl。

   384 孔板：每孔 20µl。

   例如，若 96 孔板每孔已铺板 60µl 细胞，那么则应取 20µl 4X 处理化合物加至培养基中。一般来说，需处理细胞 6~24 小时，或根据使用的具体刺激物种类也可能需要更长处理时间，直至观察到释放大量 IL-4。

   可选：若手动分装至 384 孔检测模式，则应于不同添加步骤后，短暂离心微孔板（700~900rpm 条件下离心约 10 秒），然后置于板振荡器上短暂混合，从而确保充分混匀。

普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司 地址：北京市东城区北三环东路 36 号环球贸易中心 B 座 907-909 技术支持电话：400 810 8133
Promega (Beijing) Biotech Co., Ltd 电话：010-58256268 网址：www.promega.com 技术支持邮箱：chinatechserv@promega.com

CTM 687
2022 制作

4.B. 制备人 IL-4 标准品稀释液

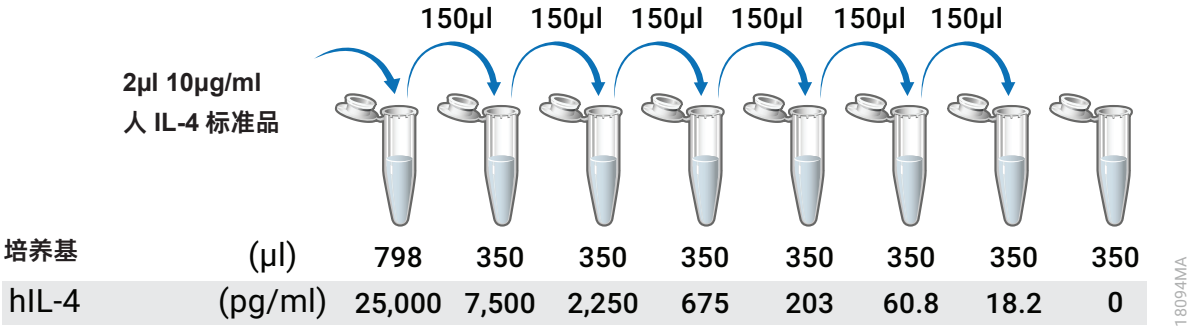


图 3. 人 IL-4 系列稀释液。

细胞处理即将结束前，使用细胞样品培养用培养基制备 IL-4 稀释液。

说明：若使用的是多细胞模型且每一细胞模型需不同培养基，则必须使用不同培养基制备相应标准品系列稀释液。

1. 临用前，解冻人 IL-4 标准品（室温约 15 分钟）。
2. 启用前，先短暂离心阳性对照管，然后吹打使之混匀。
3. 使用预热后细胞培养基并按 1:400 稀释比例对人 IL-4 标准品（10µg/ml）进行稀释，从而制备起始浓度（25000pg/ml）的人 IL-4。例如，取 2µl 人 IL-4 标准品储备液加至 798µl 培养基，从而制备 800µl 25000pg/ml 人 IL-4（参见图 3）。
4. 取 7 支试管（或于稀释槽七个隔室），每一试管或每一隔室加入 350µl 培养基。
5. 制备 3.33 倍标准品系列稀释液。取 150µl 25000pg/ml 起始浓度人 IL-4 稀释液（步骤 3）加至 350µl 培养基中，以进行第二次稀释。吹打混匀并重复相同步骤 5 次，从而制备 7 个浓度水平（浓度范围为 18.2pg/ml~25000pg/ml）的标准品稀释液。最后一个孔或隔室仅应加入培养基用作本底对照。

   说明：不同稀释步骤应使用不同移液器吸头且应使用气溶胶过滤吸头，从而避免分析物残留。
6. 细胞处理结束后，取标准稀释液和本底对照（2 个复孔）加至检测板的两列（请参见第 3 节，检测板图）。

   ***96* 孔板：**每孔分装 80µl。

   384 孔板：每孔分装 20µl。

   说明：

   a. 剩余人 IL-4 标准品（10µg/ml）可置于 4℃条件下储存 1 个月。若标准品的储存时间超过 1 个月，则应进行分装，并置于低于 -65℃条件下储存。避免反复冻融。

   b. 我们建议在每块检测板上添加人 IL-4 标准品对照，以便进行归一化处理。

4.C. 添加 5X 抗 hIL-4 抗体混合物至检测孔

说明：若使用的是多细胞模型且每一细胞模型需不同培养基，则必须使用不同培养基制备对应的 5X 抗 hIL-4 抗体混合物。

1. 临用前，从储存处取出抗 hIL-4 抗体。若有必要，应解冻。

   说明：若 Lumit™ 检测缓冲液 B 尚未解冻，则此时还应将其从储存处取出解冻并平衡至室温。若有必要，可通过水浴加速解冻。若使用的是目录号为 W6061 的 25ml 缓冲液，则您可能需在第 4.D 节使用前，先对缓冲液进升温。

2. 启用前，先短暂离心抗 hIL-4 抗体管，然后吹打使之混匀。

3. 临用前，使用预热培养基并按 1:100 稀释比例对两种抗体进行稀释，从而制备 5X 抗体混合物。吹打使抗体溶液混匀。若需检测整块 96 孔板或 384 孔板（包括过量试剂，用于弥补移液过程损耗），则应根据下述内容制备 5X 抗体混合物:

试剂	体积
culture medium	2352µl
Anti-hIL-4 mAb-SmBiT	24µl
Anti-hIL-4 mAb-LgBiT	24µl

4. 取 5X 抗 -hIL-4 抗体混合物加至含有培养细胞或标准品稀释液的孔中，若从高浓度分析物至低浓度分析物依次添加，则应尽量每次更换移液器吸头，从而避免孔之间出现交叉污染。

   96 孔板：每孔分装 20µl 5X 抗 hIL-4 抗体混合物至 80µl 细胞或 IL-4 标准品稀释液中。

   384 孔板：每孔分装 5µl 5X 抗 hIL-4 抗体混合物至 20µl 细胞或 IL-4 标准品稀释液中。

5. 使用板振荡器混匀片刻（例如，250~350rpm 混合 10 秒）

6. 于 5%CO_2，37℃湿润培养箱中孵育 45 分钟。

普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司 地址：北京市东城区北三环东路 36 号环球贸易中心 B 座 907-909 技术支持电话：400 810 8133
Promega (Beijing) Biotech Co., Ltd 电话：010-58256268 网址：www.promega.com 技术支持邮箱：chinatechserv@promega.com

CTM 687
2022 制作

4.D. 添加 Lumit™ 检测试剂 B 至检测孔

当细胞与抗 hIL-4 抗体混合物一起孵育时（第 4.C 节），制备 Lumit™ 检测试剂 B。

1. 取所需量 Lumit™ 检测缓冲液 B 平衡至室温。
2. 从储存处取出 Lumit™ 底物 B，并混匀。若 Lumit™ 检测底物 B 附着于管盖或管侧，则应离心片刻。
3. 使用 Lumit™ 检测缓冲液 B（室温）对 Lumit™ 检测底物 B 进行稀释（稀释比例为 1:20），从而制得检测用足量 Lumit™ 检测试剂 B。若需检测 96 孔板或 384 孔板（包括过量试剂，用于弥补移液过程损耗），则应根据下述内容制备 5X Lumit™ 检测试剂 B：

试剂	体积
Lumit™ Detection Buffer B	3040µl
Lumit™ Detection Substrate B	160µl

说明：

a. 检测量为 1000 的 Lumit™ Human IL-4 Immunoassay（目录号：W6061）含 25ml Lumit™ 检测缓冲液 B 和 1.25ml Lumit™ 检测底物 B。制备所得的 Lumit™ 检测试剂 B 足够同时检测 5 或 10 块板。若需使用 Lumit™ Human IL-4 Immunoassay（目录号：W6061）分别对 10 块板进行检测，那么每块板应取 2375µl Lumit™ 检测缓冲液 B 和 125µl Lumit™ 检测底物 B 混匀。

b. 复溶后，Lumit™ 检测试剂 B 于 20℃条件下放置约 3 小时后其活性便会降低 10%。复溶后的试剂于 4℃条件下放置约 7 小时后其活性会降低 10%。

4. 孵育（第 4.C 节步骤 6）后，将含细胞的检测板置于室温条件下平衡 15 分钟。
5. 取 5X Lumit™ 检测试剂 B（室温）加至检测板的每一孔中。

   96 孔板：每孔分装 25µl。

   384 孔板：每孔分装 6.25µl。
6. 使用板振荡器混匀片刻（例如，300~500rpm 混合 10 秒）
7. 置于室温条件下孵育 3~5 分钟。
8. 读取发光信号。

   说明：检测信号稳定，半衰期约为 2 小时，可与同时处理多个检测板的批量实验兼容。我们建议在每块检测板上添加人 IL-4 标准品对照，以便进行归一化处理。

5. 可选样品转移方案

此方案介绍的是将样品培养基从经处理的细胞孔转移至新的检测板中进行后续细胞因子检测的相关内容，而细胞和剩余培养基则应保存以备他用。鉴于需进行定量，因此使用培养基制备 IL-4 标准品系列稀释液进行并建立标准曲线。

5.A. 细胞铺板和处理

1. 将细胞铺板至 96 或 384 孔组织培养板中。列 1 和列 2 不添加细胞。若使用的是贴壁细胞，则应使细胞贴壁。

   说明：虽然检测方法的动态范围较大且可灵活选择细胞数量，但还是应根据经验确定特定细胞模型每孔分装的最佳细胞数量。确保释放的最高水平细胞因子不超过检测方法的线性范围。在线性范围内，可增加细胞数量从而满足低水平细胞因子检测要求。参见图 5 和 6 中人 Th2 和 PBMC 所用细胞数量示例。

2. 取特定体积的测试化合物加至每一孔中，处理细胞。最终处理量不固定。一般为：

   96 孔板：每孔 100~200µl。

   384 孔板：每孔 25~50µl。

   可选：若手动分装至 384 孔检测模式，则应于不同添加步骤后，短暂离心微孔板（700~900rpm 条件下离心约 10 秒），然后置于板振荡器上短暂混合，从而确保充分混匀。

3. 细胞处理结束后，从每一孔中取细胞培养基至新的白色检测板的相应孔中。

   96 孔板：每孔分装 50µl。

   384 孔板：每孔分装 12.5µl。

   说明：

   a. 若转移样品体积较小，则用培养基稀释至 50µl（96 孔模式）和 12.5µl（384 孔模式），后续计算细胞孔中实际细胞因子释放浓度时考虑样品稀释比例。

   b. 为提高 384 孔检测模式的灵敏度（若有需要），您可取 20µl 样品（和标准品）转移至检测孔中，然后每孔加入 5µl 5X 抗 hIL-4 抗体混合物（于第 4.C 节制备）。

普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司 地址：北京市东城区北三环东路 36 号环球贸易中心 B 座 907-909 技术支持电话：400 810 8133
Promega (Beijing) Biotech Co., Ltd 电话：010-58256268 网址：www.promega.com 技术支持邮箱：chinatechserv@promega.com

CTM 687
2022 制作

5.B. 制备人 IL-4 标准品稀释液

细胞处理即将结束前，使用细胞样品培养用培养基制备 IL-4 稀释液。

说明：若使用的是多细胞模型且每一细胞模型需不同培养基，则必须使用不同培养基制备相应标准品系列稀释液。

1. 临用前，解冻人 IL-4 标准品（室温约 15 分钟）。
2. 启用前，先短暂离心阳性对照管，然后吹打使之混匀。
3. 使用预热后细胞培养基并按 1:400 稀释比例对人 IL-4 标准品（10µg/ml）进行稀释，从而制备起始浓度（25000pg/ml）的人 IL-4。例如，取 2µl 人 IL-4 标准品储备液加至 798µl 培养基，从而制备 800µl 25000pg/ml 人 IL-4（参见图 3）。
4. 取 7 支试管（或于稀释槽七个隔室），每一试管或每一隔室加入 350µl 培养基。
5. 制备 3.33 倍标准品系列稀释液。取 150µl 25000pg/ml 储备液加至 350µl 培养基中，以进行第二次稀释。混匀并重复相同步骤 5 次，从而制备 7 个浓度水平（浓度范围为 18.2pg/ml~25000pg/ml）的标准品稀释液。最后一个孔或隔室仅应加入培养基用作本底对照。

   说明：不同稀释步骤应使用不同移液器吸头且应使用气溶胶过滤吸头，从而避免分析物残留。
6. 将培养基从处理后细胞孔中转移至新的检测板后，取标准品稀释液和本底对照（复孔）加至转移板的两列中（参见第 3 节，检测板图）。

   96 孔板：每孔分装 50µl。

   384 孔板：每孔分装 12.5µl。

   说明：

   a. 剩余人 IL-4 标准品（10µg/ml）可置于 4℃条件下储存 1 个月。若标准品的储存时间超 1 个月，则应进行分装，并置于低于 -65℃条件下储存。避免反复冻融。

   b. 我们建议在每块检测板上添加人 IL-4 标准品对照，以便进行归一化处理。

5.C. 添加 2X 抗 hIL-4 抗体混合物至检测孔

说明：若使用的是多细胞模型且每一细胞模型需不同培养基，则必须使用不同培养基制备 2X 抗 hIL-4 抗体混合物。

1. 临用前，从储存处取出抗 hIL-4 抗体。若有必要，应解冻。

   说明：同时，还应从储存处取出 Lumit™ 检测缓冲液 B，若尚未解冻，则应先平衡至室温。若有必要，可通过水浴加速解冻。若使用的是目录号为 W6061 的 25ml 缓冲液，则您可能需在第 5.D 节使用前，先对缓冲液进升温。

2. 启用前，先短暂离心抗 hIL-4 抗体管，然后吹打使之混匀。

3. 临用前，使用预热培养基并按 1:250 稀释比例对两种抗体进行稀释，从而制备 2X 抗体混合物。吹打使抗体溶液混匀。若需检测整块 96 孔板或 384 孔板（包括过量试剂，用于弥补移液过程损耗），则应根据下述内容制备 2X 抗体混合物:

试剂	体积
culture medium	5952µl
Anti-hIL-4 mAb-SmBiT	24µl
Anti-hIL-4 mAb-LgBiT	24µl

4. 取 2X 抗 -hIL-4 抗体混合物加至转移后培养基（样品）或 IL-4 标准品稀释液中，若从高浓度分析物至低浓度分析物依次添加，则应更换移液器吸头，从而避免孔之间出现交叉污染。

   96 孔板：每孔分装 50µl 2X 抗 hIL-4 抗体混合物至 50µl 培养基或标准品稀释液中。

   384 孔板：每孔分装 12.5µl 2X 抗 hIL-4 抗体混合物至 12.5µl 培养基或标准品稀释液中。

5. 使用板振荡器混匀片刻（例如，250~350rpm 混合 10 秒）

6. 于室温条件下孵育 60 分钟。

   说明：室温下孵育，使用含 HEPES 的培养基所得结果最好。若培养基不含 HEPES，CO2 培养箱外的缓冲能力则受到限制。添加检测试剂前，可将板置于 37℃，CO_2 培养箱中培养（若后续平衡至室温）。

普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司 地址：北京市东城区北三环东路 36 号环球贸易中心 B 座 907-909 技术支持电话：400 810 8133
Promega (Beijing) Biotech Co., Ltd 电话：010-58256268 网址：www.promega.com 技术支持邮箱：chinatechserv@promega.com

CTM 687
2022 制作

5.D. 添加 Lumit™ 检测试剂 B 至检测孔

当样品、标准品稀释液与抗 -hIL-4 抗体混合物一起孵育时（第 5.C 节），制备 Lumit™ 检测试剂 B。

1. 取所需量 Lumit™ 检测缓冲液 B 平衡至室温。
2. 从储存处取出 Lumit™ 底物 B，并混匀。若 Lumit™ 检测底物 B 附着于管盖或管侧，则应离心片刻。
3. 使用 Lumit™ 检测缓冲液 B（室温）对 Lumit™ 检测底物 B 进行稀释（稀释比例为 1:20），从而制得检测用足量 Lumit™ 检测试剂 B。若需检测 96 孔板或 384 孔板（包括过量试剂），则应根据下述内容制备 5X Lumit™ 检测试剂 B:

试剂	体积
Lumit™ Detection Buffer B	3040µl
Lumit™ Detection Buffer B	160µl

说明：

a. 检测量为 1000 的 Lumit™ Human IL-4 Immunoassay（目录号：W6061）含 25ml Lumit™ 检测缓冲液 B 和 1.25ml Lumit™ 检测底物 B。制备所得的 Lumit™ 检测试剂 B 足够同时检测 5 或 10 块板。若需使用 Lumit™ Human IL-4 Immunoassay（目录号：W6061）分别对 10 块板进行检测，那么每块板应取 2375µl Lumit™ 检测缓冲液 B 和 125µl Lumit™ 检测底物 B 混匀。

b. 复溶后，Lumit™ 检测试剂 B 于 20℃条件下放置约 3 小时后其活性便会降低 10%。复溶后的试剂于 4℃条件下放置约 7 小时后其活性会降低 10%。

4. 孵育（第 5.C 节，步骤 6）后，将 Lumit™ 检测试剂 B（室温）加至孔板的每一检测孔中：

   96 孔板：每孔分装 25µl。

   384 孔板：每孔分装 6.25µl。

5. 使用板振荡器混匀片刻（例如，300~500rpm 混合 10 秒）
6. 置于室温条件下孵育 3~5 分钟。
7. 读取发光信号。

   说明：检测信号稳定，半衰期约为 2 小时，可与同时处理多个检测板的批兼容。

6. 结果计算

使用可进行非线性回归分析或三次样条曲线拟合的软件（例如 GraphPad® Prism）建立已知浓度细胞因子标准曲线。

然后，对不同细胞样品中细胞因子浓度进行插值计算。由于 Lumit™ 标准曲线的动态范围较宽且线性度良好，因此适用于二阶或三阶多项式回归曲线拟合以及三次样条曲线拟合。虽然四参数逻辑（4PL）曲线拟合较为常用，但由于 Lumit™ 标准曲线的线性动态范围较宽不适用于进行 S 形曲线拟合（8），因此该拟合方式并非首选。

此外，除准确度略差外，平均 RLU（扣除本底）与细胞因子校正标样浓度的重对数坐标图与 Microsoft Excel® 中乘幂趋势线进行拟合（参见第 7 节），然后再对不同细胞样品中细胞因子浓度进行插值计算。

7. 代表数据

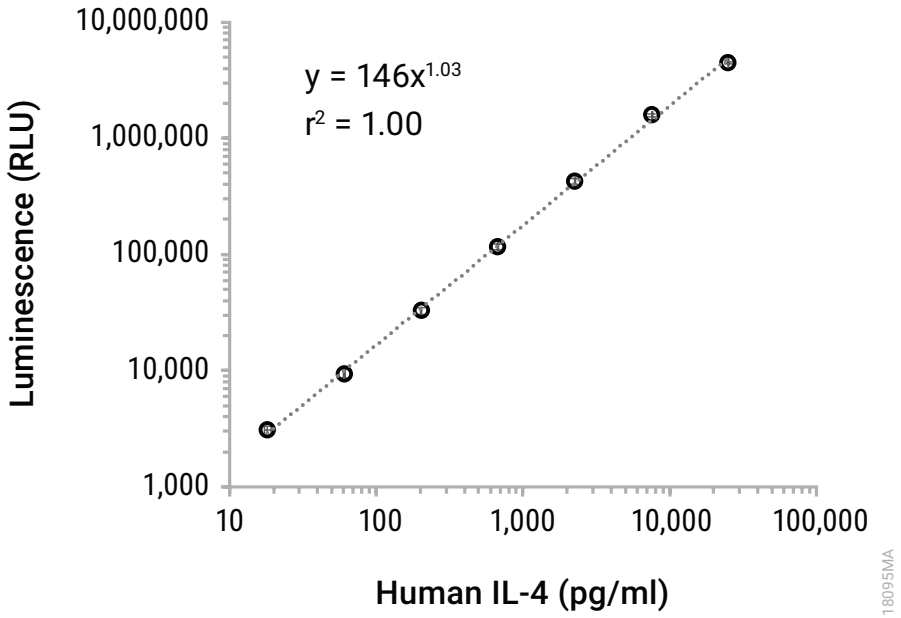


图 4. Lumit™ IL-4 (Human) Immunoassay 的标准曲线。此图为代表性标准曲线，但不可将其用于未知样品的计算。针对每一检测板建立标准曲线，从而对实验样品中细胞因子浓度进行插值计算。**说明:** 通过减去本底 RLU 确定发光信号值。

普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司 地址：北京市东城区北三环东路 36 号环球贸易中心 B 座 907-909 技术支持电话：400 810 8133
Promega (Beijing) Biotech Co., Ltd 电话：010-58256268 网址：www.promega.com 技术支持邮箱：chinatechserv@promega.com

CTM 687
2022 制作

表 1. 检测精密度。于一块板上对三份已知浓度人 IL-4 样品进行 20 次检测，从而评估试验内精密度。通过标准曲线（使用 GraphPad® Prism 软件进行三次样条拟合）对每一检测板中每一孔内 IL-4 浓度进行插值计算。

检测精密度

重复样品数量	40	40	40
预期浓度（pg/ml）	20000	2000	200
平均浓度（pg/ml）	18632	1865	167
标准偏差	620	101	13
%CV	3.3	5.4	7.6
% 预期浓度均值	93.2	93.2	83.7
百分比范围	84~105	83~112	73~108

说明：多次检测测得最小可检测剂量（MDD）高于本底两个标准偏差，hIL-4 的最小可检测剂量（MDD）为 4.5±0.3pg/ml。

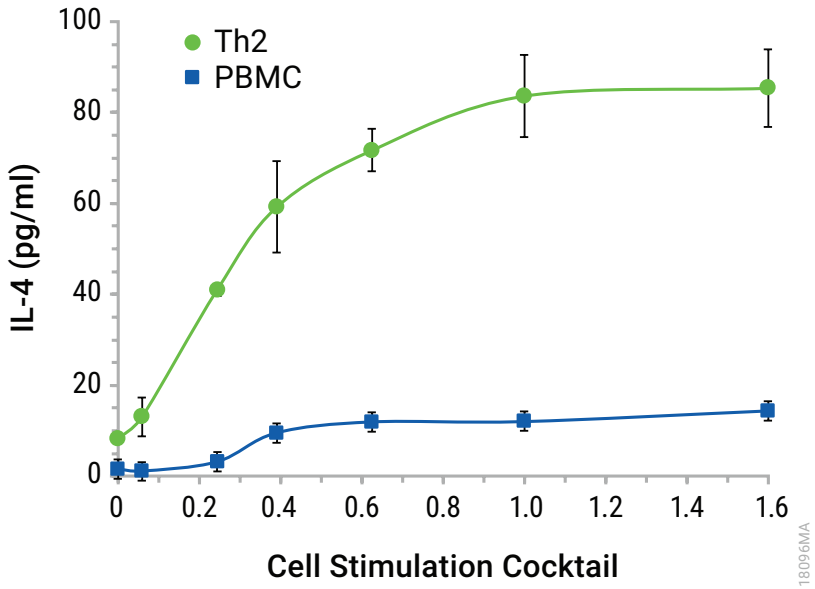


图 5. Lumit™ 检测人 Th2 和 PBMC 释放的 IL-4。按 30000 个细胞 / 孔铺板密度将人辅助型 T 细胞 2（Th2；由 CD4 + T 细胞分化）和外周血单核细胞（PBMC；BioIVT 四个供体混合细胞）铺板于装有 RPMI 1640（含 0.5mM β-ME 和 1mM 丙酮酸，用于 Th2 细胞）+ 10% 热灭活 FBS 的 96 孔板中。第 2 天，使用递增浓度细胞刺激混合物（CSC；Invitrogen 目录号：00-4970-93）处理细胞 24 小时。1X CSC 为 81nM 12- 豆蔻酸 -13- 乙酸佛波醇（PMA）和 1.34μM 离子霉素的混合物。处理后，取 5X 抗 hIL-4 抗体混合物分装至细胞孔中，并在孵育 1 小时后，加入 Lumit™ 检测试剂 B。通过三次样条插值法（GraphPad® Prism 8）和标准曲线对发光信号读数进行分析，从而测定 IL-4 释放水平。

8. 疑难解答

如果您遇到的问题在此没有列出，请联系普洛麦格（北京）生物技术有限公司或当地经销商。联系信息见：www.promega.com 电子邮箱：chinatechserv@promega.com

问题	原因和参考建议
处理后的细胞无信号。	确保已使用 Lumit™ IL-4 (Human) Immunoassay 检测人细胞。Lumit™ IL-4 (Human) Immunoassay 无法有效检测其他物种 IL-4。
人 IL-4 标准曲线线性不佳。	制备 3.33 倍稀释液应谨慎小心，避免较高浓度引起的污染。为避免残留，我们建议进行每一稀释步骤时均应更换气溶胶过滤移液器吸头。检测方法灵敏度和大线性范围（ > 3 log）意味着任何水平的残留均会对线性造成影响。此外，还应确保本底对照未被 IL-4 污染。
标准曲线相对光单位（RLU）较小和 / 或差异性较大	使用前，先将培养基、人 IL-4 标准品和 Lumit™ 检测缓冲液 B 升至室温。虽然培养条件、温度等因素可能会使 RLU 发生变化，但是只要标准曲线样品与测试样品均于相同条件下、同一板中被检测，那么便可准确定量 IL-4 释放量。
检测本底显著高于既往实验	检测本底偶尔可能受培养基中特定批次 FBS 影响。使用其他批次 FBS 确认检测性能。此外，确保检测前制备的抗体混合物未久置（超过规定时间）。

普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司 地址：北京市东城区北三环东路 36 号环球贸易中心 B 座 907-909 技术支持电话：400 810 8133
Promega (Beijing) Biotech Co., Ltd 电话：010-58256268 网址：www.promega.com 技术支持邮箱：chinatechserv@promega.com

CTM 687
2022 制作

9. 附录

9.A. 评价 Lumit™ Cytokine Immunoassay 的交叉反应

表 2. 测试 Immunoassay 的交叉反应。使用相应重组标准品对 Lumit™ cytokine immunoassay 的特异性进行评估。除仅含培养基的孔（用于本底检测）外，检测孔（3 个复孔）中均加入 10ng/ml 指定细胞因子标准品并用 Lumit™ cytokine immunoassay 进行检测。每一细胞因子平均检测信号归一化为 Lumit™ cytokine immunoassay 预期靶标前，先减去本底发光信号。对于 Lumit™ IL-4(Human) Immunoassay，测试细胞因子测得信号小于或等于 0.06% 人 IL-4 信号。

Lumit™ Cytokine Immunoassay（检测对照百分比）

标准品 (10ng/mL)	hIL-1β	hIL-2	hIL-4	hIL-6	hIL-10	hIFN-γ	hTNF-α
hIL-1β	100	0.01	0.02	0	0	0.02	0
hIL-2	0	100	0.02	0	0	0.01	0
hIL-4	0.06	0.01	100	0	0.02	0.01	0
hIL-6	0.07	0.02	0.06	100	0.02	0.03	0
hIL-10	0.18	0.03	0.03	0.03	100	0.04	0
hIFN-γ	0.10	0.03	0.03	0.03	0.02	100	0.03
hTNF-α	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.03	100

9.B. 使用 Lumit™ IL-4 (Human) Immunoassay 进行多重检测

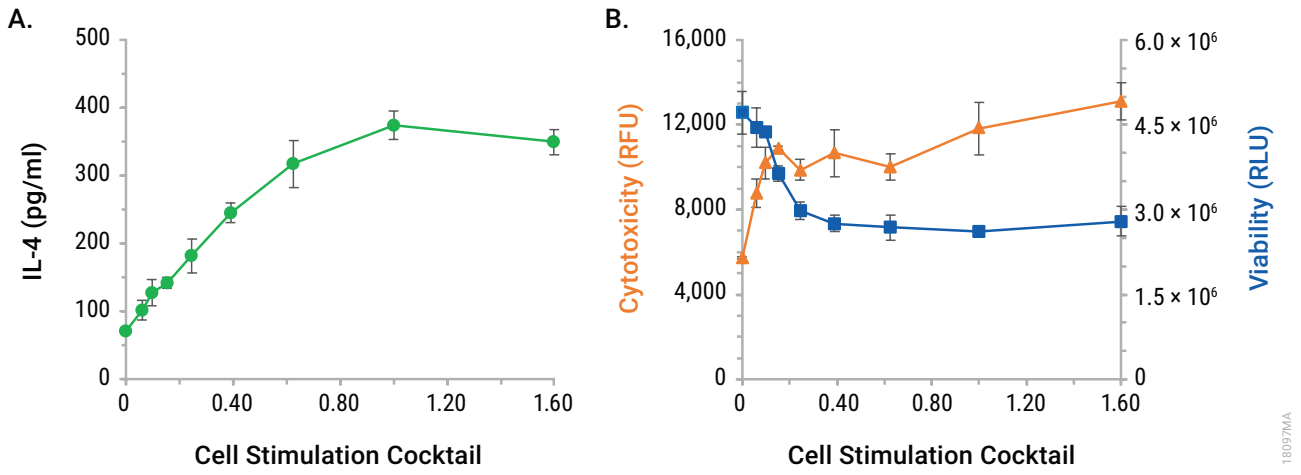


图 6. 处理后人 Th2 中 IL-4 释放量、细胞毒性和存活率的同孔检测。按 30000 个细胞 / 孔铺板密度将人辅助型 T 细胞 2（Th2，由 CD4 + T 细胞制得）铺板于装有 RPMI 1640（含 0.5mM β-ME 和 1mM 丙酮酸）+ 10% 热灭活 FBS 的全白 96 孔板中，然后用 5ng/ml 重组人 IL-2 过夜处理。然后，使用递增浓度细胞刺激混合物（CSC）处理细胞 24 小时（每孔总体积为 70µl）。处理后，将 10µl 10X CellTox™ Green Reagent（根据 CellTox™ Green Cytotoxicity Assay 中文说明书 TM375 所述内容用检测缓冲液进行制备）和 20µl 5X 抗 -hIL-4 抗体混合物（第 4 节）加至每一孔中。测量细胞毒性荧光信号（RFU）前，将检测板置于 37℃，5%CO_2 湿润培养箱中培养 45 分钟。加入 25µl Lumit™ 检测试剂 B（评价人 IL-4 释放量）前，先将检测板置于室温条件下平衡 15 分钟。最后，将 100µl 裂解 CellTiter-Glo® 试剂加至每一孔中（根据 CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay 中文说明书 TB288 所述内容进行操作），然后将板置于 350rpm 条件下振荡 2 分钟并孵育 10 分钟，最后测量发光信号（RLU）。发光信号代表的是细胞存活率。**图 A.** CSC 处理后观察到人 IL-4 的释放且呈剂量依赖性。**图 B.** 观察到 CSC 浓度越大，处理 24 小时后细胞毒性越大和细胞存活率降低。**说明：**与未经处理细胞（数据未列出）相比，加入对照细胞毒剂（50µg/ml 洋地黄皂苷）造成细胞死亡数最大且萤光读数超 20000RFU（使用 CellTox™ Green Cytotoxicity Assay，目录号：G8741），且存活率信号（以发光信号表示，使用 CellTiter-Glo® Viability Assay，目录号：G7570）降低 98% 以上。

普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司 地址：北京市东城区北三环东路 36 号环球贸易中心 B 座 907-909 技术支持电话：400 810 8133
Promega (Beijing) Biotech Co., Ltd 电话：010-58256268 网址：www.promega.com 技术支持邮箱：chinatechserv@promega.com

CTM 687
2022 制作

9.C. 参考文献

1. Brown, M.A. and Hural, J. (1997) Functions of IL-4 and control of its expression. *Crit. Rev. Immunol.* **17 (1),** 1-32.
2. Steinke, J.W. and Borish, L. (2001) Th2 cytokines and asthma—Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respir. Res*. **2 (2),** 66-70.
3. Li, Z., Chen, L. and Qin, Z. (2009) Paradoxical roles of IL-4 in tumor immunity. *Cell. Mol. Immunol*. **6 (6)**, 415-22.
4. Suzuki, A. et al. (2015) Targeting of IL-4 and IL-13 receptors for cancer therapy. *Cytokine* **75 (1)**, 79-88.
5. Gadani, S.P. et al. (2012) IL-4 in the brain: A cytokine to remember. *J. Immunol.* **189 (9)**, 4213-9.
6. Dixon, A.S. et al. (2016) NanoLuc complementation reporter optimized for accurate measurement of protein interactions in cells. *ACS Chem. Biol*. **11,** 400-8.
7. Hwang, B.B. et al. (2020) A homogeneous bioluminescent immunoassay to probe cellular signaling pathway regulation. *Commun. Biol*. **3**, 8.
8. Herman, R.A., Scherer, P.N. and Shan, G. (2008) Evaluation of logistic and polynomial models for fitting sandwich-ELISA calibration curves. *J. Immunol. Methods* **339**, 245-58.

9.D. 相关产品

Lumit™ Immunoassays

产品	规格	目录号
Lumit™ FcRn Binding Immunoassay	100 assays	W1151
Lumit™ HMGB1 (Human/Mouse) Immunoassay	100 assays	W6110
Lumit™ Human IL-1β Immunoassay	100 assays	W6010
Lumit™ IFN-γ (Human) Immunoassay	100 assays	W6040
Lumit™ IL-2 (Human) Immunoassay	100 assays	W6020
Lumit™ IL-6 (Human) Immunoassay	100 assays	W6030
Lumit™ IL-10 (Human) Immunoassay	100 assays	W6070
Lumit™ Mouse IL-1β Immunoassay	100 assays	W7010
Lumit™ TNF-α (Human) Immunoassay	100 assays	W6050

Additional sizes available.

9.D.相关产品（续）

Lumit™ Immunoassay Reagents

产品	规格	目录号
Lumit Detection Reagent B*	100 assays	VB4050
Lumit™ Immunoassay Cellular Systems–Starter Kit	200 assays	W1220
Lumit™ Immunoassay Labeling Kit*	1 each	VB2500

*Additional sizes available.

Inflammation Assays

产品	规格	目录号
Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay	10ml	G9951
RealTime-Glo™ Extracellular ATP Assay	200 assays	GA5010

Additional sizes available.

Cell Viability Assays

产品	规格	目录号
CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay	10ml	G9241
CellTiter-Glo® Cell Viability Assay	10ml	G7570
RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay	100 reactions	G9711
CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay	10ml	G6080

Additional sizes available.

Cytotoxicity Assays

产品	规格	目录号
LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay	10ml	J2380
CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay	10ml	G9290
CellTox™ Green Cytotoxicity Assay	10ml	G8741

Additional sizes available.

普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司 地址：北京市东城区北三环东路 36 号环球贸易中心 B 座 907-909 技术支持电话：400 810 8133
Promega (Beijing) Biotech Co., Ltd 电话：010-58256268 网址：www.promega.com 技术支持邮箱：chinatechserv@promega.com

CTM 687
2022 制作

Energy Metabolism and Oxidative Stress Assays

产品	规格	目录号
NAD/NADH-Glo™ Assay	10ml	G9071
NADP/NADPH-Glo™ Assay	10ml	G9081
ROS-Glo™ H_2O_2 Assay	10ml	G8820
GSH/GSSG-Glo™ Assay	10ml	V6611
Lactate-Glo™ Assay	5ml	J5021
Glucose-Glo™ Assay	5ml	J6021
Glutamine/Glutamate-Glo™ Assay	5ml	J8021
Glycerol-Glo™ Assay	5ml	J3150
Triglyceride-Glo™ Assay	5ml	J3160
Cholesterol/Cholesterol Ester-Glo™ Assay	5ml	J3190

Additional sizes available.

Apoptosis Assays

产品	规格	目录号
Caspase-Glo® 3/7 Assay System	2.5ml	G8090
Caspase-Glo® 8 Assay System	2.5ml	G8200
Caspase-Glo® 9 Assay System	2.5ml	G8210
RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay	100 assays	JA1011

Additional sizes available.

[a]U.S. Pat. Nos. 9,797,889; 9,797,890; 10,107,800; 10,648,971; and other patents and patents pending.

[b]U.S. Pat. No. 8,809,529, European Pat. No. 2635582, and other patents and patents pending.

© 2022 Promega Corporation. All Rights Reserved.

Caspase-Glo, CellTiter-Glo, NanoBiT and NanoLuc are registered trademarks of Promega Corporation. CellTiter-Fluor, CellTox, CytoTox-Glo, Ester-Glo, Glucose-Glo, Glutamine/Glutamate-Glo, Glycerol-Glo, GSH/GSSG-Glo, Lactate-Glo, LDH-Glo, Lumit, NAD/NADH-Glo, NADP/NADPH-Glo, RealTime-Glo, ROS-Glo and Triglyceride-Glo are trademarks of Promega Corporation.

Corning is a registered trademark of Corning, Inc. Dilux is a registered trademark of Dilux, L.L.C. Excel and Microsoft are registered trademarks of Microsoft Corporation. GIBCO is a registered trademark of Thermo Fisher Scientific. GraphPad Prism is a registered trademark of GraphPad Software, Inc.

Products may be covered by pending or issued patents or may have certain limitations. Please visit our Web site for more information.

All prices and specifications are subject to change without prior notice.

Product claims are subject to change. Please contact Promega Technical Services or access the Promega online catalog for the most up-to-date information on Promega products.