

## EcoPlex™ 人 Th1/Th2/Th17 细胞 7 指标多因子试剂盒

货号: MPH006

规格: 96 T

### 产品组分

产品编号	产品名称	96T	保存条件
MPH006A	1× Premixed Antibody-Conjugated Beads Human Th1/Th2/Th17 7-Plex Panel	4.7 mL	2-8°C shading light
MPH006B	2× Premixed Biotinylated Detection Antibodies Human Th1/Th2/Th17 7-Plex Panel	1.25 mL	2-8°C
MPH006C	2× Detection Antibody Diluent	1.25 mL	2-8°C
MPH006D	Lyophilized Antigen Standard Human Th1/Th2/Th17 7-Plex Panel	1 vial	2-8°C
MPH006E	1× SA-PE	2.5 mL	2-8°C shading light
MPH006F	10× Reading Buffer	4 mL	2-8°C
MPH006G	10× Wash Buffer	15 mL	2-8°C
MPH006H	SPB Standard Diluent	2.5 mL	2-8°C
MPH006I	SPB Assay Buffer	5 mL	2-8°C
	封板膜		五张
	说明书		一份

### 产品简介

EcoPlex™ 人 Th1/Th2/Th17 细胞 7 指标多因子试剂盒基于微球的多指标检测技术, 能够实现从一份标本中同时检测多种指标。本试剂盒适用于体外定量检测人血清、血浆和细胞上清或其它生物体液样本中 IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-4、IL-17A、IL-6、IL-10 和 TNF $\alpha$  细胞因子的浓度。

### 检测原理

EcoPlex™ 试剂盒利用大小和染料平均荧光强度不同的抗体偶联珠捕获样品中的抗原。当选定的捕获珠与含有捕获抗体特异性目标的样品混合和孵育时, 每个样本与其特异性捕获珠结合, 随后加入生物素化检测抗体, 每个检测抗体将与特异性样本结合从而形成微球捕获珠-样本-检测抗体“三明治”复合物。随后加入链霉亲和素-植酸葡聚糖 (SA-PE) 与生物素化检测抗体结合, 通过流式细胞仪上机检测从而可以得到每种样本特异性的荧光信号强度。结合抗原标准品的标准曲线, 可实现对样本蛋白的定量检测。

### 检测样本类型

血清  血浆  其他生物体液  细胞上清

### 保存条件

2-8°C 避光保存, 有效期一年。

### 样本处理及自备耗材仪器

#### 1) 血清

全血样品于室温放置 1 小时或 2-8°C 过夜后于 2-8°C, 1000 ×g 离心 20 分钟, 取上清即可检测。

#### 2) 血浆

抗凝剂推荐使用 EDTA-Na<sub>2</sub>, 样品采集后 30 分钟内于 2-8°C, 1000 ×g 离心 15 分钟, 取上清即可检测。

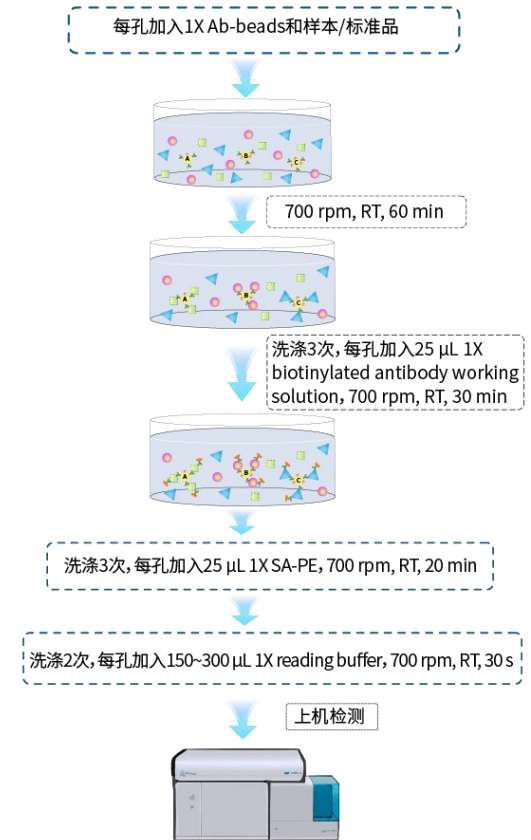
#### 3) 细胞培养上清或其它生物体液

收集液体后于 2-8°C, 1000 ×g 离心 20 分钟, 除去杂质及细胞碎片。取上清检测。

#### 4) 仪器

U 型底 96 孔透明板、涡旋仪、96 孔板恒温振荡孵育仪、96 孔板式离心机、流式细胞仪 (配备 PE 和 APC 或 PE-Cy5 或 PE-Cy7 检测通道)

### 实验流程



图例:

Premixed antibody-conjugated bead  
 biotinylated detection antibody  
 Analytes

## 试剂配制

### 1) 1×Reading Buffer

将 10×Reading Buffer 平衡至室温，涡旋振荡 15 秒。将 4 mL 的 10×Reading Buffer 与 36 mL 的 ddH<sub>2</sub>O 混合，即为 1×Reading Buffer。2-8°C 可保存 3 个月。

### 2) 1×Wash Buffer

将 10×Wash Buffer 平衡至室温，涡旋振荡 15 秒。将 15 mL 的 10×Wash Buffer 与 135 mL 的 ddH<sub>2</sub>O 混合，即为 1×Wash Buffer。室温可保存 3 个月。

### 3) 1×Biotinylated Detection Antibodies

将 2×Detection Antibody Diluent 全部加入到 2×Premixed Biotinylated Detection Antibodies 中，轻轻涡旋混匀，即为 1×Biotinylated Detection Antibodies。避光 2-8°C 可保存 24 小时。

## 冻干标准品复溶

- 1) 将 Lyophilized Antigen Standard 2000 ×g 离心 10 秒，加入 250 μL SPB Standard Diluent
- 2) 轻轻涡旋混匀 15 秒
- 3) 在冰上孵育 5-10 分钟
- 4) 梯度稀释前轻轻涡旋混匀 15 秒

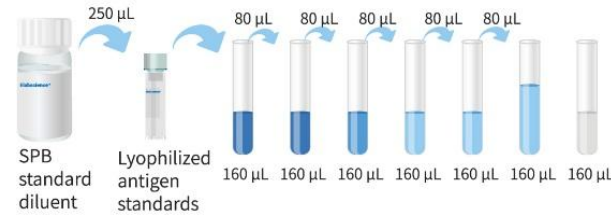
**注：标准品制备、梯度稀释直至进行实验过程不要超过 2 小时。建议标准品不要进行冷冻、解冻和反复使用。**

## 梯度标准品稀释

取 7 支 EP 管，每管中加入 160 μL SPB Standard Diluent，从复溶后的标准品工作液中吸取 80 μL 到第一支 EP 管中混匀，按此步骤往后依次吸取混匀。如下图示。最后一管直接作为空白孔，不需要再从倒数第二管中吸取液体。稀释后的标准品置于冰上备用。

**注：每稀释一个梯度均需用枪吹吸 6-8 次以充分混匀，每次加样需更换枪头，以免发生污染。如果样本中细胞因子含量**

**较低（小于 10 pg/mL），建议再稀释 1-2 孔标准品，即标准品 8（1：2187）、标准品 9（1：6561），分析数据的时候可以舍去标准品 1。**



## 反应检测

- 1) 准备实验所需的 U 型底 96 孔板，标记“标准品”和“样本”孔。每孔分别设置 1-2 个复孔。
- 2) 将 Premixed Antibody-Conjugated Beads 涡旋混匀 15 秒，每孔加入 45 μL beads，剩余 beads 2-8°C 避光保存。
- 3) 将 96 孔板于板式离心机 300 ×g 离心 5 分钟，直接甩板弃去孔内液体。

**注：甩板时直接将板倒置过来甩掉液体，不要进行二次甩板。**

- 4) “样本”孔每孔加入 15 μL 样本和 30 μL SPB Assay Buffer；“标准品”孔每孔加入 45 μL 标准品。（如果细胞上清样本中的细胞因子浓度较低（小于 20 pg/mL），可直接加入 45 μL 样本）
- 5) 用封板膜封板，放置于恒温振荡孵育仪上室温 700 rpm 避光孵育 60 分钟。
- 6) 去掉封板膜，将 96 孔板于板式离心机 300 ×g 离心 5 分钟，直接甩板弃去孔内液体。
- 7) 每孔加入 100 μL 1×Wash Buffer，300 ×g 离心 5 分钟，直接甩板弃去孔内液体，共洗涤 3 次。
- 8) 每孔加入 25 μL 1×Biotinylated Detection Antibodies。
- 9) 用封板膜封板，放置于恒温振荡孵育仪上室温 700 rpm 避光孵育 30 分钟。
- 10) 去掉封板膜，将 96 孔板于板式离心机 300 ×g 离心 5 分

钟，直接甩板弃去孔内液体。

- 11) 每孔加入 100 μL 1×Wash Buffer，300 ×g 离心 5 分钟，直接甩板弃去孔内液体，共洗涤 3 次。
- 12) 每孔加入 25 μL 1×SA-PE。
- 13) 用封板膜封板，放置于恒温振荡孵育仪上室温 700 rpm 避光孵育 20 分钟。
- 14) 去掉封板膜，将 96 孔板于板式离心机 300 ×g 离心 5 分钟，直接甩板弃去孔内液体。
- 15) 每孔加入 100 μL 1×Wash Buffer，300 ×g 离心 5 分钟，直接甩板弃去孔内液体，共洗涤 2 次。
- 16) 每孔加入 150-300 μL 1×Reading Buffer。
- 17) 用封板膜封板，放置于恒温振荡孵育仪上室温 700 rpm 避光振荡 30 秒。
- 18) 去掉封板膜，上机检测。

**注：如果不能立即上机，可放置于 2-8°C 避光保存 16 小时，上机之前需于振荡孵育仪上 700 rpm 避光振荡 30 秒。如果流式细胞仪不能检测 96 孔板，需要将孔中的样品转移到流式管中进行检测。**

## 流式细胞仪检测

### 1. 设置通道

此试剂盒微球的最大激发光为 700 nm，检测染料为 PE，可使用 488 nm 激发光的 PE 通道进行检测。大部分流式细胞仪配备 488 nm 激发光，可使用 PE-Cy5 通道进行检测，或使用 488 nm 激发光的 PE-Cy7 通道、633/640 nm 激发光的 APC 通道进行检测。

### 2. 准备调试微球

分别在流式管或 96 孔板中加入 75 μL Premixed Antibody-Conjugated Beads，然后加入 100-200 μL 1×Reading Buffer。此为调试机器的空白微球。

### 3. 建立模板

- 1) 打开新程序，建立 FSC-SSC 散点图、两个 PE (X 轴)

APC/PE-Cy7/PE-Cy5 (Y轴) 对数散点图。

- 2) 检测空白微球, 调整 FSC-SSC 散点图, 使两群微球落在预定的范围, 设 SSC 较小的的群为 “Gate1”, 较大的微球群设为 “Gate2”, 如图 1。
- 3) 分别在 PE (X轴) -APC/PE-Cy7/PE-Cy5 (Y轴) 对数散点图内分析 “Gate1” 和 “Gate2”, 保证所有微球群位于坐标轴内。调节 APC/PE-Cy7/PE-Cy5 通道电压, 使各个散点图内微球分群清晰, 如图 2 (左图为 Gate1 分析图, 右图为 Gate2 分析图)。

注: 如果为 PE (X轴) - PE-Cy7/PE-Cy5 (Y轴) 对数散点图则需适当调节补偿使微球群处于水平位置。

- 4) 根据荧光大小不同圈出各指标对应的微球群, 建立 PE 直方图。
- 5) 保存模板。

注: 以下模板图仅供参考, 不同试剂盒 “Gate” 不同, 实验者需根据自己的实验建立模板。

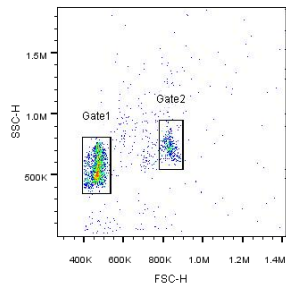


图 1

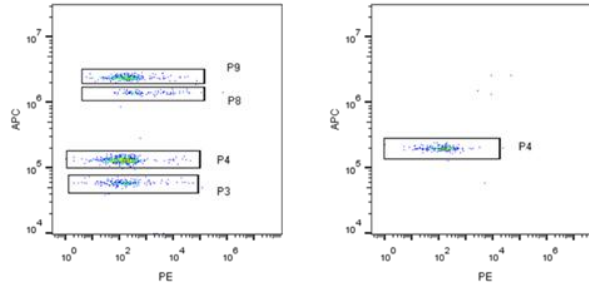


图 2

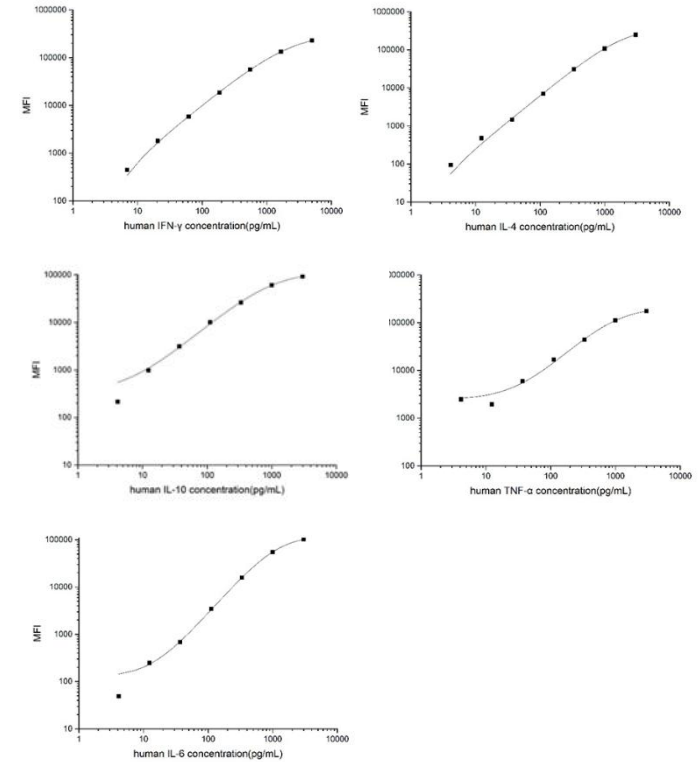
#### 4. 检测样本

- 1) 样本上机检测前检查流式细胞仪状态及各参数设置, 确保仪器状态正常。
- 2) 将样本于恒温振荡孵育仪上室温 700 rpm 避光振荡 30 秒。
- 3) 打开模板上机检测, 设置每个 P 门下的微球收集数量至少 200 个。例如, Gate1 要检测 4 种不同荧光强度的微球群, 则需要检测  $4 \times 200 = 800$  个微球。
- 4) 采集完成后进行数据分析。

#### 5. 数据分析

- 1) 计算标准品和样本复孔的中位数荧光强度值 (MFI) 并减去空白孔的 MFI 值作为校正值。以浓度为横坐标, MFI 值为纵坐标, 在双对数坐标轴上拟合四参数逻辑函数的标准曲线。
- 2) 若样品 MFI 值高于标准曲线上限, 应适当稀释后重测并在计算样本浓度时乘以相应的稀释倍数。

#### 结果展示



注: 以上标准曲线仅供参考, 不同试剂盒标准曲线不同, 实验者需根据自己的实验建立标准曲线。

## 性能参数

各指标性能参数（流式门、标准品浓度、灵敏度、LLOQ、ULOQ、回收率、板内精密度变异系数、板间精密度变异系数和交叉反应）详见各批次 COA。

9. 为了达到好的实验结果，请只使用本公司试剂盒内提供的试剂，不要混用其他制造商的产品，严格按照说明书操作。

## 常见问题及解决方案

现象	可能原因	建议
上样收集到的微球量低	吸取微球过少	取用微球前充分振荡混匀
	洗涤过程损失较多微球	洗涤甩板时用力适当且勿进行二次甩板
	微球聚集在板底或管底	检测或者转移到流式管之前于振荡器上 700rpm 振荡 30 秒
标准品检测值跳孔	孔间污染	每孔加样时需更换枪头，去掉封板膜时应小心操作，避免沾到其他孔
检测灵敏度低	标准品未充分复溶	冻干标准品加入标准稀释液后需冰上孵育 5-10 分钟
检测不出样本值	样本本身含量过低	样本加样时无需稀释，直接加入原液进行检测

## 注意事项

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究使用。
2. 请注意安全事项，遵守实验室试剂操作规范操作。
3. 使用微球液之前需充分涡旋混匀，避免微球聚集导致每孔微球分布不均。
4. 每孔加样需更换枪头，避免孔间污染。
5. 去掉封板膜时小心操作，避免沾到其他孔。
6. 在“标准品”、“样本”孔间操作时，每次都要更换枪头，加样时避免产生气泡。
7. 洗涤 96 孔板时，推荐使用排枪加入洗涤液。
8. 由于操作过程中试剂制备以及流式细胞仪参数设置不正确，可能导致结果异常，实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器。