

Aptplex™Human Immune Tolerance 12-Plex Panel

货号：MPA012

规格：96 T

产品组分

产品编号	产品名称	96T	保存条件
MPA012A	捕获微球悬液	2.4mL×2	2-8℃ shading light
MPA012B	生物素化抗体	4.8mL×2	2-8℃
MPA012C	SA-PE	4.8mL×2	2-8℃ shading light
MPA012D	定量标准品	2 瓶	2-8℃
MPA012E	缓冲液	5mL×1	2-8℃
MPA012F	磁珠清洗液	30mL×2	2-8℃
	封板膜	五张	
	说明书	一份	

产品简介

Aptplex™人免疫耐受相关12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-γ、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IL-2RA(sCD25)、CXCL10（IP-10）、CCL5（RANTES）、CCL3（MIP-1α）、CCL4(MIP-1β）、sCD54（ICAM-1）、ST2 细胞因子的浓度。

检测原理

Aptplex™试剂盒利用染料平均荧光强度不同的抗体偶联磁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定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-藻红蛋白(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℃ 避光保存，有效期12个月。开瓶后避光2~8℃保存，可保存不超过30天。校准品复溶后24小时内使用。

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℃过夜后于2-8℃，1000×g离心20 min，取上清即可检测。

2) 血浆

抗凝剂推荐使用EDTA-Na₂，样品采集后30 min内于2-8℃，1000×g离心15 min，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℃，1000×g离心20 min，除去杂质及细胞碎片。取上清检测。如果细胞培养上清样本的稀释度比较大，可先用培养基进行预稀释，最后用样本稀释液稀释。如需保存，可将样本置于-20至-80℃中分装保存(24小时内检测可置于2-8℃)，避免反复冻融。

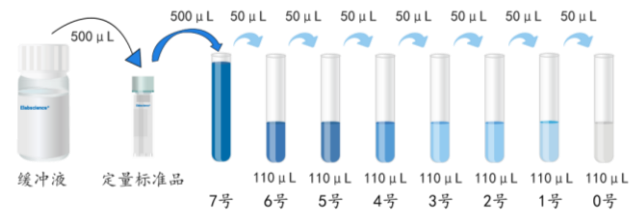
4) 仪器

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(双光六色流式细胞仪，应当包含PE、APC、APC/Cy7通道)

标准品配制步骤

准备8个0.6 mL离心管作为标准品梯度管，标记编号0~7；7号管留空，0~6号管中加入110 μL缓冲液。

- 1) 标准品为冻干粉，使用前500×g离心10 s使标准品集中于管底，向定量标准品瓶中加入500 μL缓冲液，静置5 min，再用加样枪轻轻吹打2-3次，使标准品充分溶解混匀并转移至7号管，为最高浓度标准液；
- 2) 取50 μL 7号管中的标准品溶液至6号管中混匀，即为1:3.2稀释标准液；
- 3) 随后依次从6-2号管中取50 μL标准品溶液至下一标准品梯度管，依次梯度稀释得到5~1号管标准液；0号管中的缓冲液作为0浓度标准液。如下图：



备注：最高浓度标准液可能会有不同浓度(详见标准品标签)

操作步骤

- 1) 96孔板中加入50 μL捕获微球溶液(加入前涡旋混匀至少15 s)、50 μL样本或者标准品溶液，盖好覆膜后放置于孔板恒温振荡仪中室温600 rpm避光孵育1 h。
- 2) 反应结束后放置在磁吸板上磁吸1 min，甩去孔内液体后，加入100 μL生物素化抗体，盖好覆膜后放置于孔板恒温振荡仪中室温600 rpm避光孵育1 h。
- 3) 反应结束后放置在磁吸板或磁吸架上磁吸1 min，甩去孔内液体，各孔加入200 μL磁珠清洗液，放置在96孔磁吸板上磁吸1 min，甩去孔内液体，加入100 μL SA-PE，盖好覆膜后放置于孔板恒温振荡仪中室温600 rpm避光孵育0.5 h。
- 4) 反应结束后放置在磁吸板或磁吸架上磁吸1 min，甩去孔内液体，各孔加入200 μL磁珠清洗液，放置在96孔磁吸板上磁吸1 min，甩去孔内液体，各孔加入200 μL磁珠清洗液重悬微球。
- 5) 上机检测。

(用户也可根据自身的实验情况和实验仪器调整实验方案)

流式细胞仪检测

样本测试数据采集

- 1) 使用本试剂盒对样本进行检测(手动圈门分析示例);
- 2) 建立 FSC-H/SSC-H 散点图, 调节 FSC 和 SSC 的增益, 将细胞因子粒子团用矩形 P1 门圈出, 如图 1 所示;

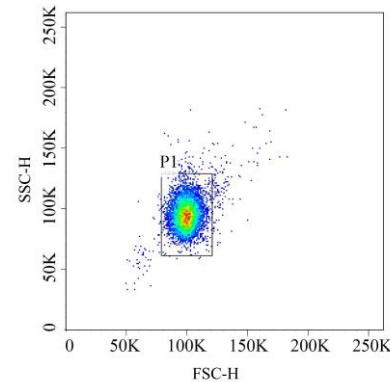


图 1

- 3) 建立 APC-H/APC-Cy7-H 散点图, 从 P1 门微球主团中识别出各编码, 并将细胞因子单因子粒子团分别用矩形门圈出, 如图 2 所示;

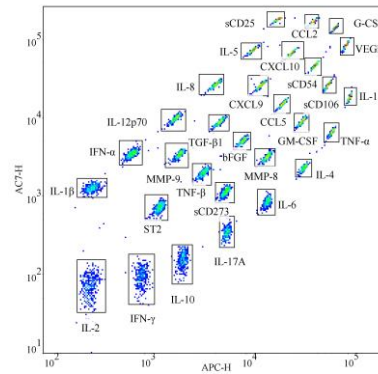


图 2

- 4) 微球编码无重叠干扰的情况下, 建立 PE-H 和 APC-H 散点图, 使得所有的微球群能够清楚和明显的分布于散点图上, 显示各因子 PE 荧光强度, 见图 3。

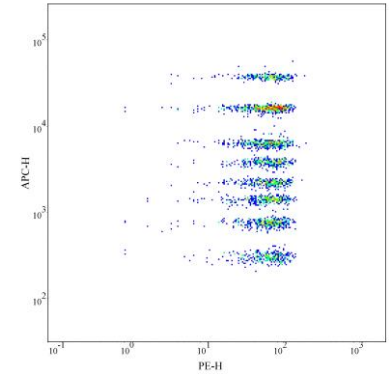


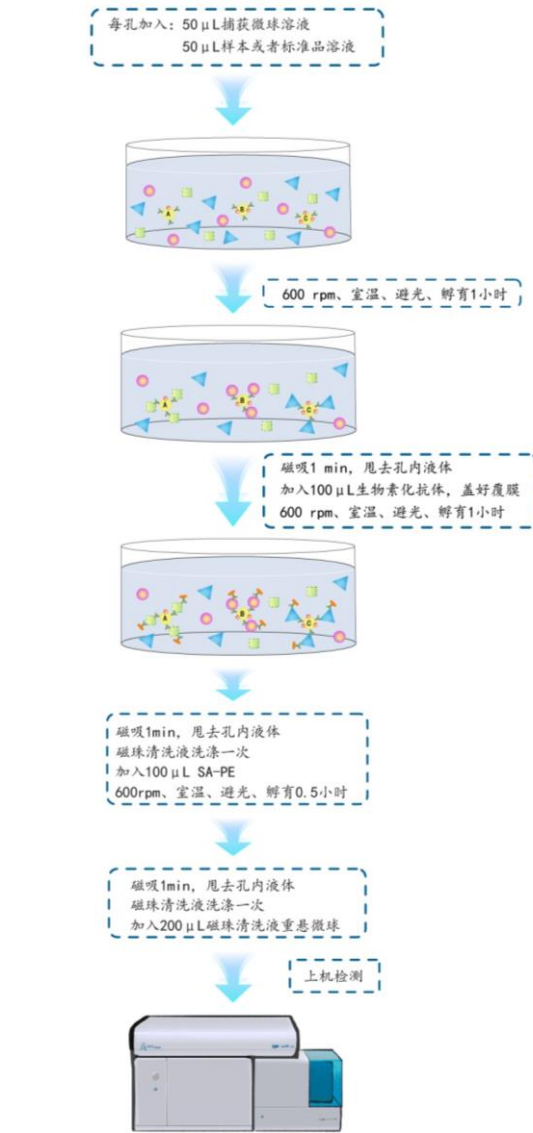
图 3

(以上图示仅供参考, 实验者需根据所购试剂盒建立模板)

数据分析

- 1) 打开模板上机检测, 设置每个细胞因子门下的微球收集数量至少 200 个。例如, 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。采集完成后进行数据分析。
- 2) 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。
- 3) 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。
- 4) 数据分析: 可使用 Elabscience Aptplex™ 分析软件或其他商品化软件对实验数据进行分析。

(注: 如需要数据分析, 请联系技术支持)



图例:

捕获微球

生物素化抗体

▲ ● ■ 待测样本

性能参数

1. 检测范围：

细胞因子	线性范围
IFN- γ	5-5000 pg/ml
IL-2	5-5000 pg/ml
IL-4	5-5000 pg/ml
IL-5	5-5000 pg/ml
IL-10	5-5000 pg/ml
IL-2RA(sCD25)	10-5000 pg/ml
CXCL10 (IP-10)	10-5000 pg/ml
CCL5 (RANTES)	10-5000 pg/ml
CCL3 (MIP-1 α)	10-5000 pg/ml
CCL4(MIP-1 β)	10-5000 pg/ml
40-10000 pg/ml	40-10000 pg/ml
ST2	20-10000 pg/ml

2. 空白限：空白检测限均 $\leq$ 8 pg/mL

3. 回收率：回收率范围为 70%-120%

4. 重复性：批内批间变异系数 $\leq$ 15%

5. 特异性：本试剂盒中各因子之间无交叉反应。

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 600 rpm 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混匀静置 5min
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。负责数据揭示和出具报告的实验人员需经过正规的技术培训。
2. 请注意安全事项，遵守实验室试剂操作规范。本品含荧光素，切勿直接接触皮肤或沾染食物，操作时务必戴手套操作。
3. 流式细胞仪未经正确校准、荧光渗漏未进行合理补偿以及检测区域(设门)未精确定位，则可能产生错误的检测结果。请参考该仪器操作规程进行校准，确保仪器在使用前处于最佳检测状态。
4. 使用前，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。
5. 为防止污染，每孔加样需更换枪头；去掉封板膜时小心操作，避免沾到其他孔；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；洗涤 96 孔板时，推荐使用排枪加入洗涤液。
6. 为确保荧光检测质量，凡涉及检测抗体的相关步骤均需避光操作。
7. 不同批号试剂请勿混用，不混用其他制造商的产品，严格按照说明书操作，请在有效期范围内使用产品。