LMB287Hu 96T

整合素α5(ITGa5)检测试剂盒

(磁性微球Luminex单因子夹心法)

适用生物：人

使用说明书

仅供体外研究使用，不用于临床诊断!

第一版

[预期应用]

本试剂盒运用双抗体夹心法定量测定人血清、血浆、组织匀浆、细胞裂解液、细胞培养上清或其它相关生物液体中ITGa5含量。

[试剂盒内容]

试剂名称	数量	试剂名称	数量
96孔板（空白被）	1	96孔板覆膜	4
标准品	2	标准品稀释液	1×20mL
磁珠	1	分析缓冲液	1×20mL
检测溶液A	1×120μL	检测稀释液A	1×12mL
检测溶液B（PE-SA）	1×120μL	检测稀释液B	1×12mL
鞘液	1×10mL	浓洗涤液（30×）	1×20mL
使用说明书	1		

[需自备的设备及试剂]

1、Luminex MAGPIX®, Luminex 100™, Luminex 200™, 或Bio-Rad®,Bio-Plex®分析仪（建议仪器使用前提前预热,并做好自检和校准）
2、单道或多道微量移液器及吸头
3、稀释样品的EP管.
4、蒸馏水或去离子水
5、磁力架
6、盛放洗液的容器
7、0.01mol/L（或1×）磷酸缓冲盐 (PBS), pH=7.0-7.2
8、旋涡振荡器
9、酶标板振荡器

[试剂盒的储存及有效期]

1、 未开封的试剂盒：所有试剂均按试剂瓶标签上所示保存。请注意，收到试剂盒后请尽快将标准品、检测溶液A、检测溶液B以及96孔板保存于-20° C，其余试剂请置于4° C保存备用。
2、 使用后的试剂盒：剩余试剂仍需按照试剂瓶标签所示的温度保存。

注意：

试剂盒内酶标条可拆卸，按实验需求可分多次使用；使用后的剩余试剂盒建议在首次实验后1个月内使用完毕。产品过期时间以盒子上的标签为准，保质期内所有组分都确保是稳定的。

[标本的采集与保存]

组织匀浆：不同类型的组织制备匀浆的方法会有所不同

1）取适量组织块，在预冷PBS（0.01mol/L， pH=7.0-7.2）中清洗去除血液，匀浆前先称重。
2）将组织切成小块，均匀的放入放置在冰上的装有新鲜裂解缓冲液(货号ISO07，应依据目标蛋白的亚细胞定位选择不同类型的缓冲液)的玻璃均质器中（微小的组织也要如此）。（质量体积比=1:20-1:50，例如：1mL裂解缓冲液中加入20-50mg组织样本。）
3）将得到的悬浊液经过超声处理至澄清。
4）将制备好的匀浆液10,000×g离心5分钟，弃沉淀，上清即可用于检测或置于-20° C下保存。

细胞裂解液：在分析试验之前，细胞需利用以下方法处理：

1）贴壁细胞应该用冷PBS轻轻清洗，然后用胰蛋白酶消化，于1,000×g离心5分钟后收集。（悬浮细胞可通过离心直接收集）。
2）将收集到的细胞用冷PBS洗3次；
3）将细胞用新鲜裂解缓冲液重悬至密度为107个细胞/毫升，如果需要，细胞可以进行超声波处理至溶液澄清。
4）将标本于2-8° C 1,500×g离心10分钟，弃沉淀，上清即可用于检测或置于-20° C下保存。

细胞培养上清或其它生物标本：请1,000×g离心20分钟，取上清即可检测，或将上清置于-20° C或-80° C保存，避免反复冻融。

注意：

1、以上标本均需密封保存，4° C保存小于1周，-20° C不超过1个月，-80° C不超过2个月。
2、标本出现溶血会影响最后检测结果，因此溶血标本不宜进行此项检测。
3、标本使用前应缓慢均衡至室温，不应加热使之融解。
4、基于大量检测数据，我们推荐使用血清而不是血浆作为样本进行检测。

[Luminex200 分析仪]

1.分析体积：50uL;
2.微球类型：磁珠MagPlex;
3.总磁珠量：50粒/域;
4.MFI值：Median.

[试剂准备]

1、使用前将所有的试剂和标本缓慢均衡至室温（18-25° C），如果该试剂盒在一段时间内不能使用，请仅取出本次试验所需的酶标条和试剂，并将剩余的酶标条及试剂按指定条件保存。
2、标准品(冻干品)：每瓶标准品加入标准品稀释液0.5mL，盖好后室温静置大约10分钟，同时轻轻摇动（避免起泡），其浓度为10.0ng/mL。准备7个稀释标准品的EP管，每个EP管中加入300μL的标准品稀释液，如图所示依次倍比稀释成10.0ng/mL, 2.5ng/mL, 0.62ng/mL, 0.16ng/mL, 0.04ng/mL, 0.01ng/mL, 0.0ng/mL，标准品稀释液(0ng/mL)直接作为空白孔。为保证实验结果有效性，每次实验请使用新的标准品溶液。

item	1	2	3	4	5	6	7	Tube
ITGa5	10.0	2.5	0.62	0.16	0.04	0.01	0	ng/mL

3、检测溶液A及检测溶液B：Detection A 及Detection B在使用前请用手甩几下或短暂离心处理，以使黏附在管壁或瓶盖的液体沉积到管底。临用前分别以检测稀释液A或B 1:100稀释(如：10μL检测溶液A/990μL检测稀释液A)，充分混匀，稀释前根据预先计算好的每次实验所需的总量配制(100μL/孔)，实际配制时应多配制0.1-0.2mL。

4、浓洗涤液：580mL蒸馏水或去离子水加入20mL洗涤液（30×）稀释至600mL至工作液浓度。

注意：

1、标准品的稀释不能直接在板中进行。

2、标准品请于临用前15分钟内配制。该标准品只能使用一次。

3、标准品、检测溶液A工作液、检测溶液B工作液请使用相应的稀释液配制，稀释液不能混用。用移液枪轻轻吹打充分混匀，避免起泡。为保证实验结果的准确性请使用微量吸管，并校准微量移液器。请依据所需的量精确配制，尽量不要使用微量配制的方法（如吸取检测溶液A时，一次不要小于10μL），以避免造成浓度误差。

4、请勿重复使用已经稀释过的标准品、检测溶液A工作液和检测溶液B工作液。

5、洗涤液（30x）中如有结晶析出，请先温育至室温，轻轻混匀，至到结晶完全溶解再进行配制。

6、试剂盒中部分试剂为储存液，客户需配置成工作液后使用，在配置过程中可能因为纯净水质量差或水质污染，以及实验中所用耗材洁净度差，造成实验结果不准确，甚至完全错误。请使用双蒸水配置。

[标本处理]

1、本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用该试剂盒所造成的样本消耗负责，请使用者使用前充分考虑到样本的可能使用量，预留充足的样本。

2、实验前应先预测样本中待测物浓度。当浓度不在标准曲线的范围内时，用户必须确定其特定实验的最佳样品稀释倍数。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。样本稀释需用PBS。

3、若所检样本不包含在说明书所列样本之中，建议进行预实验验证其有效性，并注意留存样本。

4、使用化学裂解液制备的组织匀浆或细胞提取液可能会由于某些化学物质的引入导致实验结果偏差。

5、若样本为细胞培养上清，因为该类样本干扰因素较多，如：细胞状态、细胞数量、采样时间等，所以可能存在检测不出的情况。

6、某些天然蛋白或重组蛋白，包括原核及真核重组蛋白，可能因为与本产品所使用的检测抗体及捕获抗体不匹配，而不被检测出。

7、建议使用新鲜样本，保存时间过长可能会因蛋白降解或变性而导致实验结果偏差。

[操作步骤]

1、将实验板的每孔内加入200ul分析缓冲液用以预湿，封闭后在酶标板振荡器上室温震荡10分钟，之后甩干孔内液体，即可用于加样操作。

2、加样：分别设标准孔、待测样品孔、空白孔。设标准孔7孔，依次加入100μL不同浓度的标准品（见试剂准备2）。空白孔加100μL标准品稀释液（见试剂准备第二步最后一管），余孔加待测样品（或稀释后的样品）100μL，每孔加10ul磁珠，酶标板加上覆膜，37°C酶标板振荡器温育1.5小时，振动频率设置为800rpm，振幅2-4mm，防止磁珠沉降。

3、上磁力架，2分钟后弃去液体，磁力保持的状态下甩干，不用洗涤。

4、每孔加检测溶液A工作液100μL（临用前配制），酶标板覆膜，37°C酶标板振荡器温育1小时，振动频率设置为800rpm，振幅2-4mm，防止磁珠沉降。

5、上磁力架，2分钟后弃去液体，每孔用200μL的洗涤液洗涤，浸泡1-2分钟，弃去孔内所有液体。重复洗板3次。最后一次洗涤后，吸取或倒出剩余的洗涤缓冲液，将酶标板倒扣在吸水纸上，将残留在孔内的液体全部吸干。此过程也可自动磁力洗板机来完成。

6、去除磁力，每孔加检测溶液B工作液（临用前配制）100μL，酶标板覆膜，37°C酶标板振荡器温30分钟，振动频率设置为800rpm，振幅2-4mm，防止磁珠沉降。

7、上磁力架，2分钟后弃去液体，每孔用200μL的洗涤液洗涤，浸泡1-2分钟，弃去孔内所有液体。洗板3次，方法同步骤5。

8、去除磁力，每孔加鞘液150μL，旋涡震荡2分钟，使微球呈悬浮状态，即可上机读数。

注意：

1、试剂准备：准备一次实验所需要的酶标条，其它的可从微孔板上拆下，密封，按照说明书要求保存，以备下次使用。

2、加样：实验操作中请使用一次性的灭菌吸头，避免污染。加样时注意不要有气泡产生，将样品加于酶标板底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀。与反应试剂加入一样，加样过程中第一个孔与最后一个孔加样时间间隔尽量小（一般控制在10分钟以内），如果太大，将会导致不同的“预温育”时间，从而明显地影响到测量值的准确性及重复性。为了测值的准确性，推荐设置复孔进行实验。

3、温育：为防止样品蒸发，实验时请将加上盖或覆膜的酶标板置于湿盒内，以避免液体蒸发，洗板后应尽快进行下步操作，任何时侯都应避免酶标板处于干燥状态，同时应严格遵守给定的温育时间和温度。

4、洗涤：充分洗涤非常重要，在每次洗涤过程中，都要将洗涤液完全甩干。如果使用自动洗板机，请在熟练使用后再用于正式实验过程中。

5、如果实验室内湿度低于60%，推荐使用加湿器提高湿度水平。

[实验原理]

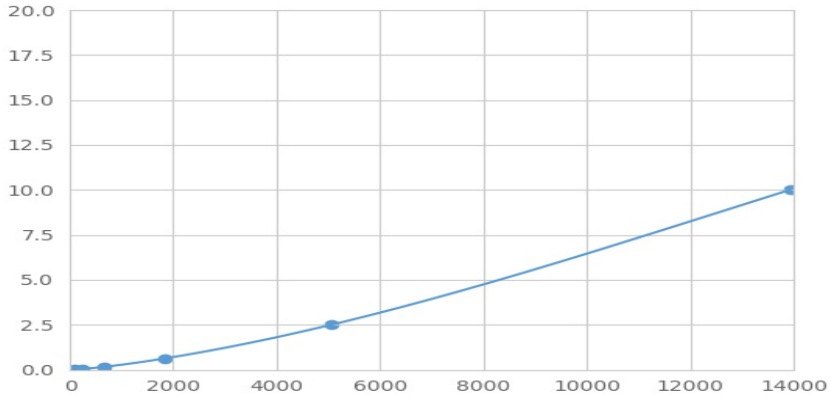
将ITGa5抗体包被于磁性微球表面，制成固相载体，向微球中分别加入标准品或标本，其中ITGa5与连接于固相载体上的抗体结合，然后加入生物素化的ITGa5抗体，在将未结合的生物素化抗体洗净后，加入PE标记的亲和素，PE被激发后，根据MFI值（Median Fluorescence Intensity）的大小和样品中的ITGa5浓度呈正相关。用Luminex分析仪测定，计算样品浓度。

[计算]

各标准品及样本MFI值扣除空白孔MFI值后作图（七点图），如设置复孔，则应取其平均值计算。以标准品的浓度为纵坐标（或对数坐标），MFI值为横坐标（或对数坐标），绘出标准曲线（最佳方程式应依回归方程计算的R2值来定，以R2值越趋近于1为好）。推荐使用专业制作曲线软件进行分析，如curve expert 1.30，根据样品MFI值，由标准曲线查出相应的浓度，乘以稀释倍数；或用标准物的浓度与MFI值计算出标准曲线的回归方程式，将样品的MFI值代入方程式，计算出样品浓度，再乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。

[典型数据]

为了便于计算，尽管浓度为自变量而MFI值为因变量，我们绘图时仍采用标准品的MFI值作为横坐标（X轴），标准品的浓度为纵坐标（Y轴）。同时为了试验结果的直观性，图中提供的是原始数据而非对数值。推荐使用对数值建立标准曲线图。由于实验操作条件的不同（如操作者、移液技术、洗板技术和温度条件等），标准曲线的MFI值会有所差异。所提供的标准曲线仅供参考，实验者需要根据自己的实验建立标准曲线。



(整合素α5)检测试剂盒标准曲线

[检测范围]

0.01-10ng/mL.

[最低检测限]

此值为20个空白样品（即标准品稀释液）测定的平均值加二倍标准差所对应的浓度。

[特异性]

本试剂盒用于检测ITGa5，经检测与其它相似物质无明显交叉反应。
由于受到技术及样本来源的限制，不可能完成所有相关或相似物质交叉反应检测，因此本试剂盒有可能与未经检测的其它物质有交叉反应。

[精密度]

精密度用样品测定值的变异系数CV表示。CV（%） = SD/mean×100
批内差：取同批次试剂盒对低、中、高值定值样本进行定量检测，每份样本连续测定20次，分别计算不同浓度样本的平均值及SD值。
批间差：选取3个不同批次的试剂盒分别对低、中、高值定值样本进行定量测定，每个样本使用同一试剂盒重复测定8次，分别计算不同浓度样本的平均值及SD值。
批内差： CV<10%
批间差： CV<12%

[稳定性]

经测定，试剂盒在有效期内务必按推荐温度保存，活性降低率将小于5%。
为减小外部因素对试剂盒破坏前后检测值的影响，实验室的环境条件需尽量保持一致，尤其是实验室内温度、湿度及温育条件。其次由同一实验员来进行操作可减少人为误差。

[实验流程]

1、实验前标准品、试剂及样本准备；
2、加样（标准品或样本）100μL，加磁珠，37° C酶标板振荡器孵育1.5小时；
3、磁吸甩干，加检测溶液A100μL，37° C酶标板振荡器孵育1小时；

4、磁吸洗板3次；
5、加检测溶液B100μL，37°C振动孵育30分钟；
6、磁吸洗板3次；
7、加鞘液150μL，旋涡震荡2分钟后读数。

[说明]

1、由于现有条件及科学技术水平尚不能对供货商提供的所有所有原料进行全面的鉴定与分析，本产品可能存在一定的质量技术风险。
2、最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境密切相关，请务必准备充足的标本备份。
3、不同批次的同一产品可能会有少许差别，如：检测限、灵敏度，请依据试剂盒内说明书进行实验操作，网站电子版说明书仅作参考。
4、本试剂盒配套试剂必须配套使用，不能混用其他制造商的产品。只有严格遵守本试剂盒的实验说明才会得到最佳的检测结果。
5、在储存及温育过程中避免将试剂暴露在强光中。所有试剂瓶盖须盖紧以防止蒸发和微生物污染，因为蛋白水解酶的干扰将导致测值不准确。
6、刚开启的酶联板板孔中可能会有少许水样物质，此为正常现象，不会对实验结果造成任何影响。酶标板在使用时从包装袋里取出，请勿提前取出。
7、由于操作者不熟练、操作失误或错误选用读数仪程序等都有可能导致错误结果的产生。实验前请仔细阅读说明书并调试仪器。
8、在样本制备以及操作的每个过程中的变化都可能导致不同的实验结果，所以为了提高实验结果的可重复性，实验的每一步操作都需要严格控制。
9、试剂盒在出厂前均经过严格质检，但由于运输条件及各实验室条件差异，可能会造成实验结果与出厂结果不一致或不同批次试剂盒批间差增大的情况。
10、本试剂盒未与其他厂家同类试剂盒或不同方法检测同一目的物的产品做对比，所以不排除检测结果不一致的情况。
11、用于制备试剂盒中抗体的免疫原通常为重组蛋白，但由于备重组蛋白所选取的片段、表达系统、纯化方式等各有不同，所以我们无法保证该试剂盒可用于其他公司重组蛋白的检测，通常我们也不建议使用试剂盒检测重组蛋白。
12、请预估样品中待测物的浓度，或者设计预实验确定样品检测浓度。这样的处理可以防止样本中待检物含量超出试剂盒检测范围。
13、该试剂盒可能不适用于一些实验本身有效性不确定的特殊实验样品的检测，例如，基因敲除实验等。
14、本操作说明同样适用于48T试剂盒。
15、该试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。

[问题解答]

问题	可能原因	解决方案
标准曲线差	标准品准备不正确	进行正确的标准品梯度稀释
	吸取及洗涤不充分	充分的吸取及洗涤
	移液不精确	检查和校正移液器

精密度低	磁珠洗涤不充分	按说明书要求充分震荡洗涤和浸泡
	混匀不充分和吸取试剂不足	充分混匀和吸取试剂
	重复利用吸头、容器和覆膜	使用加样器要更换新的吸头、使用新的容器和覆膜
	加样不精确	检查和校正移液器
MFI值低	每孔加的试剂量不精确	校正移液器，精确加入试剂
	温育时间不正确	保证充足的温育时间
	温育温度不正确	试剂要平衡至室温并保证准确的温育温度
	PE标记物失效	更换试剂
	PE标记物稀释倍数不对	按照说明书实验操作
	超出读数时间读数	在说明书推荐的读数时间内读数
样本值	不正确的样本储存方式	正确储存样本，使用新鲜样本进行实验
	不正确的样本收集和处理方法	采取正确的样本收集和处理方法
	待测物质在样本中含量低	使用新鲜样本，重复实验