LMB824Mu ，96T

NFkB 等多因子检测试剂盒

（流式荧光发光法）

适用生物：小鼠

使用说明书

仅供研究使用，不用于临床诊断！

第 5.3 版

实验前请仔细阅读说明书，本说明书第 1-8 页基于流式细胞术，适用仪器：NovoCyte D2060R,Navios, FACSMelody, Gallios,DxFLEX,CytoFLEX S,NovoCyte D2060R,Navios,FACSMelody,Gallios, DxFLEX,CytoFLEX S 等；9-15 页基于 Luminex 系统，适用仪器：Luminex MAGPIX,Luminex 100,Luminex 200,FLEXMAP 3D,Bio-Plex 等。

[预期应用]

定量测定样本（血清、血浆、组织匀浆、细胞裂解液、细胞培养上清等）中 NFkB 的含量。

[试剂盒内容]

试剂名称	数量	试剂名称	数量
96孔板（8*12，可拆卸板）	1	浓缩洗涤液（30×）	1×20mL
预混合标准品	2	96孔板覆膜	4
预混合包被磁珠	1×1mL	标准品稀释液	1×20mL
设置磁珠	1×0.4mL	分析缓冲液	1×20mL
预混合检测溶液A	1×120μL	检测稀释液A	1×12mL
检测溶液B	1×120μL	检测稀释液B	1×12mL
鞘液	1×10mL	使用说明书	1

[需自备的设备及试剂]

1、 流式细胞仪：NovoCyte D2060R, Navios,FACSMelody,Gallios,DxFLEX,CytoFLEX S,NovoCyte D2060R, Navios, FACSMelody，Gallios，DxFLEX，CytoFLEX S 等（建议仪器使用前提前预热，并做好自检和校准，流式仪需具备 APC、APC-Cy7、PE 等通道）；
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、标准品稀释液、检测溶液 A、检测稀释液 A 保存于-20℃，其余试剂请置于 4℃ 保存备用。预混合磁珠和检测溶液 B 需避光

23603 W. Fernhurst Dr., Unit 2201, Katy, TX 77494, USA | 001-832-538-0970 | www.cloud-clone.us | mail@cloud-clone.us

保存。

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]

1、 血清：将收集于血清分离管中的全血标本在室温放置 2 小时或 4℃ 过夜，然后 1,000×g 离心 20 分钟，取上清再 2-8℃10，000×g 离心,20-30 分钟，上清即可用于检测或置于-20℃/-80℃ 下保存，避免反复冻融。

2、 血浆：用 EDTA 或肝素作为抗凝剂采集标本，并将标本在采集后的 30 分钟内于 2-8℃ 1,000×g 离心 15 分钟，取上清再 2-8℃10，000×g 离心,20-30 分钟，上清即可用于检测或置于-20℃/-80℃ 下保存，避免反复冻融。

3、 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装有新鲜裂解缓冲液(货号 IS007，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。(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 2-8℃10,000×g 离心 20-30 分钟，弃沉淀，上清即可用于检测或置于-20℃/-80℃ 下保存，避免反复冻融。

4、 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 10^7 个细胞/毫升，如果需要，细胞可以进行 4℃超声波处理至溶液澄清。
   4) 将标本于 2-8℃10，000×g 离心,20-30 分钟，弃沉淀，上清即可用于检测或置于-20℃/-80℃ 下保存，避免反复冻融。

5、 细胞培养上清或其它生物标本：请 2-8℃10，000×g 离心,20-30 分钟,上清即可用于检测或置于-20℃/-80℃ 下保存，避免反复冻融。

注意：

1、 **所有类型的标本，解冻后的都需要再次 2-8℃10,000×g 离心 20-30 分钟，取上清检测。**

2、 以上标本均需密封保存，4℃ 保存小于 1 周，-20℃ 不超过 1 个月，-80℃ 不超过 2 个月。

3、 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。

4、 样本中存在脂质、胶状物或沉淀会影响磁珠聚集沉降，从而影响检测结果，建议样本离心取上清后检测。

5、 标本使用前应缓慢均衡至室温，不应加热使之融解。

6、 在细胞培养时添加的动物血清含有高水平的未知因子，可能影响检测结果。

7、 **组织匀浆类样本和磁珠反应的时候，应室温（18-25℃）避光振荡反应 2 小时。**

[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℃），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：标准品瓶加入标准品稀释液0.5mL作为STD1，盖好后室温静置大约10分钟，同时轻轻摇动（避免起

23603 W. Fernhurst Dr., Unit 2201, Katy, TX 77494, USA | 001-832-538-0970 | www.cloud-clone.us | mail@cloud-clone.us

泡），初始浓度见下表中“STD1”。准备6个稀释标准品的EP管，每个EP管中加入300μL的标准品稀释液，如下表所示依次4倍稀释成对应浓度。每次吸取100μL混合均匀的液体加入下一个EP管中，直至第6管。第7管中仅加入标准品稀释液作为空白孔。为保证实验结果有效性，每次实验请使用新的标准品溶液。

项目	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	STD7	浓度
NFkB	10	2.5	0.625	0.1563	0.0391	0.0098	0	ng/mL

3、 预混合磁珠使用前，请用涡旋混合仪轻柔震荡防止磁珠沉降。使用期间，预混合磁珠需避光。

4、 检测溶液 A 及检测溶液 B：检测溶液 A 及检测溶液 B 在使用前请短暂离心处理，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。检测溶液 B 配置时需避光。

5、 浓缩洗涤液：580mL 蒸馏水或去离子水加入 20mL 洗涤液（30×）稀释至 600mL 即为工作液浓度。

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。**每支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，直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、 若样本量不足，请在上样之前用 PBS 补充至所需的量。

4、 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。

5、 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。

6、 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。

7、 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。

8、 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 200μL 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。

23603 W. Fernhurst Dr., Unit 2201, Katy, TX 77494, USA | 001-832-538-0970 | www.cloud-clone.us | mail@cloud-clone.us

2、 加样：分别设标准孔、待测样品孔、空白孔。标准孔依次加入 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 10μL 混匀的磁珠悬液，酶标板加上覆膜，37℃酶标板振荡避光温育 1.5 小时，振动频率设置为 800rpm，振幅 2-4mm，防止磁珠沉降。**组织匀浆类样本和磁珠反应的时候，应室温（18-25℃）避光振荡反应 2 小时。**

3、 上磁力架，2 分钟后保持磁力情况下弃去液体，或磁力保持的状态下吸出板孔内液体，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℃酶标板振荡避光温育 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，磁力保持的状态下 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，倒出孔内的洗涤液，残留在孔内的少量液体不要吸干。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℃酶标板振荡避光温育 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，洗板 3 次，方法同步骤 5。

8、 去除磁力，每孔加鞘液 100μL，酶标板覆膜，37℃酶标板振荡避光 10min，振动频率设置为 800rpm，振幅 2-4mm，使微球呈悬浮状态，即可上机读数。

[分析仪设置示例]

NovoCyte D2060R	
分析体积	50μL
荧光通道	APC、APC-Cy7、PE
磁珠量	100 粒*N
MFI 值	Median

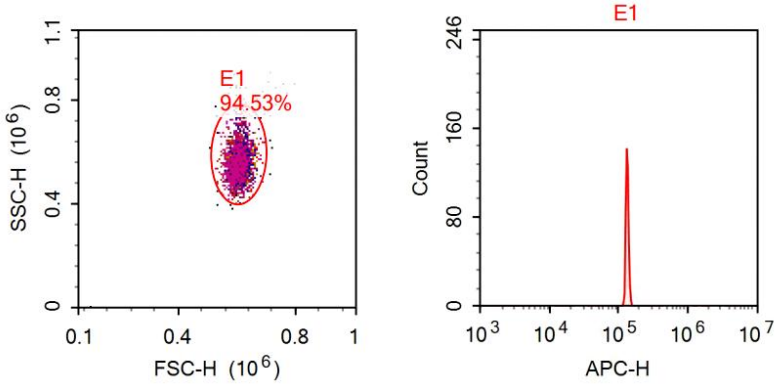
注：N 代表指标数量。

1、 启动 NovoCyte D2060R，仪器开机自检；

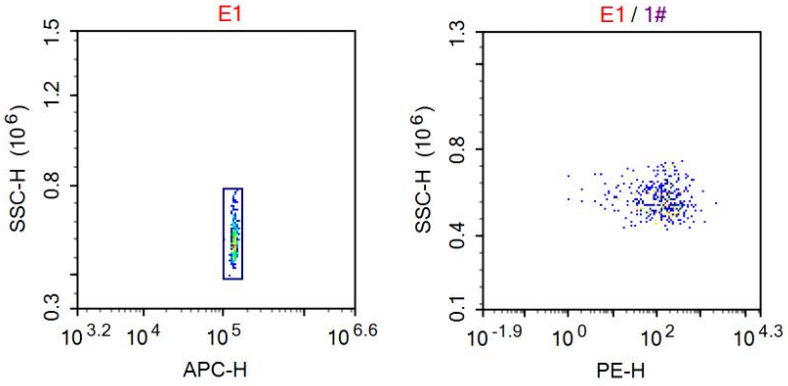
2、 准备设置磁珠，放入采样处，打开 NovoCyte D2060R；

3、 NovoCyte D2060R 软件界面，用设置磁珠进行仪器设置，建立圈门模板。

4、 进样，用建立的模板读数，之后创建统计表格，统计“Median”数据后导出数据。



23603 W. Fernhurst Dr., Unit 2201, Katy, TX 77494, USA | 001-832-538-0970 | www.cloud-clone.us | mail@cloud-clone.us



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。预混合磁珠和检测溶液 B 试剂准备和加样时需避光。

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。如果使用自动磁力洗板机，请在熟练使用后再用于正式实验。洗板时，为了避免磁珠丢失，洗涤的过程请保持酶标板在磁力架上，残留在孔内的少量液体不要吸干且不要在纸上拍打酶标板。

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。

6、 读数之前，将仪器进样针调节到距离酶标板孔底合适高度（两个垫片的高度）。

[实验原理]

将抗体包被于磁性微球表面，制成固相载体，向微孔中加入微球和标准品或标本，其中 NFkB 与连接于固相载体上的抗体结合，然后加入生物素化的抗体，在将未结合的生物素化抗体洗净后，加入 PE 标记的链霉亲和素，PE 被激发后，根据 MFI 值（Median Fluorescence Intensity）的大小和样品中的靶物质浓度呈正相关。用或流式细胞仪测定，计算样品浓度。

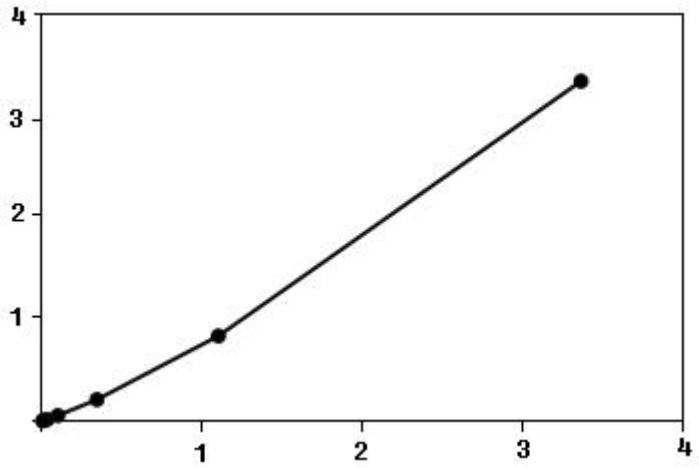
[计算]

各标准品及样本 MFI 值扣除空白孔 MFI 值后作图（六点图），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 R^2 值来定，以 R^2 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。

23603 W. Fernhurst Dr., Unit 2201, Katy, TX 77494, USA | 001-832-538-0970 | www.cloud-clone.us | mail@cloud-clone.us



X 轴：MFI 值
Y 轴：标准品的浓度
检测试剂盒标准曲线

[检测范围]

NFkB：0.0098-10ng/mL.

[最低检测限]

NFkB：0.0033ng/mL.

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 NFkB，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。

[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、 每孔加入200μL分析缓冲液预湿，封闭震荡10min；
3、 加样（标准品、样本）100μL，磁珠10μL，37℃酶标板振荡避光孵育1.5小时*；
4、 磁吸甩干，加检测溶液A 100μL，37℃酶标板振荡避光孵育1小时；
5、 磁吸洗板3次，弃液；
6、 加检测溶液B 100μL，37℃振动避光孵育30分钟；
7、 磁吸洗板3次，弃液；
8、 加鞘液100μL，37℃避光振荡10分钟后读数。

23603 W. Fernhurst Dr., Unit 2201, Katy, TX 77494, USA | 001-832-538-0970 | www.cloud-clone.us | mail@cloud-clone.us

*注：**组织匀浆类样本和磁珠反应的时候，应室温（18-25℃）避光振荡反应2小时。**

[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，请务必按照说明书的要求存放试剂盒，并在有效日期前使用。

3、 不同批次的同一产品可能会有少许差别，如：检测限、灵敏度等，请严格按照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，避免因蛋白水解酶的干扰导致测值不准确。

6、 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。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。实验前请仔细阅读说明书并调试仪器。

7、 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。

8、 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。

9、 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。

10、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。

11、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。

12、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。

23603 W. Fernhurst Dr., Unit 2201, Katy, TX 77494, USA | 001-832-538-0970 | www.cloud-clone.us | mail@cloud-clone.us

[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
	磁珠丢失	确保洗板过程保持在磁力架上，不要在吸水纸上拍打
	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
珠子数量不足	样品中的脂质、胶体或沉淀物会导致珠粒聚集和沉淀	使用前去除脂质、胶体、沉淀物等，重新离心样品，取上清液检测
	在将磁珠放入板孔之前，磁珠没有完全悬浮	将磁珠完全悬浮后，再取磁珠加入96孔板孔
	洗涤过程中丢失磁珠	使用单通道或多通道移液管在距离磁铁最远处吸液，吸除洗涤缓冲液，或者保持磁力的状态下，连同磁力架一起翻转，倒出液体
	取数前磁珠未完全重悬	通过涡旋振荡或移液管吹打使珠子完全悬浮
	仪器进样针可能堵塞	机器的进样针需要清洁，如果需要，可以移除探头并进行超声波处理

23603 W. Fernhurst Dr., Unit 2201, Katy, TX 77494, USA | 001-832-538-0970 | www.cloud-clone.us | mail@cloud-clone.us

实验前请仔细阅读说明书，本说明书第 9-15 页基于 Luminex 系统，适用仪器：Luminex MAGPIX,Luminex 100,Luminex 200,FLEXMAP 3D,Bio-Plex 等。

[预期应用]

定量测定样本（血清、血浆、组织匀浆、细胞裂解液、细胞培养上清等）中 NFkB 的含量。

[试剂盒内容]

试剂名称	数量	试剂名称	数量
96孔板（8*12，可拆卸板）	1	96孔板覆膜	4
预混合标准品	2	标准品稀释液	1×20mL
预混合磁珠	1×1mL	分析缓冲液	1×20mL
预混合检测溶液A	1×120μL	检测稀释液A	1×12mL
检测溶液B	1×120μL	检测稀释液B	1×12mL
鞘液	1×10mL	使用说明书	1
浓缩洗涤液（30×）	1×20mL		

[需自备的设备及试剂]

1、 Luminex ：Luminex MAGPIX®, Luminex 100™, Luminex 200,FLEXMAP 3D™, Bio-Rad Bio-Plex 等（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、标准品稀释液、检测溶液 A、检测稀释液 A 保存于-20℃，其余试剂请置于 4℃ 保存备用。预混合磁珠和检测溶液 B 需避光保存。
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]

1、 血清：将收集于血清分离管中的全血标本在室温放置 2 小时或 4℃ 过夜，然后 1,000×g 离心 20 分钟，取上清再 2-8℃10，000×g 离心,20-30 分钟，上清即可用于检测或置于-20℃/-80℃ 下保存，避免反复冻融。

23603 W. Fernhurst Dr., Unit 2201, Katy, TX 77494, USA | 001-832-538-0970 | www.cloud-clone.us | mail@cloud-clone.us

2、 血浆：用 EDTA 或肝素作为抗凝剂采集标本，并将标本在采集后的 30 分钟内于 2-8℃1,000×g 离心 15 分钟，取上清再 2-8℃10，000×g 离心,20-30 分钟，上清即可用于检测或置于-20℃/-80℃下保存，避免反复冻融。

3、 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装有新鲜裂解缓冲液(货号 IS007，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。(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 2-8℃10,000×g 离心 20-30 分钟，弃沉淀，上清即可用于检测或置于-20℃/-80℃下保存，避免反复冻融。

4、 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 10^7 个细胞/毫升，如果需要，细胞可以进行 4℃超声波处理至溶液澄清。

4) 将标本于 2-8℃10，000×g 离心,20-30 分钟，弃沉淀，上清即可用于检测或置于-20℃/-80℃下保存，避免反复冻融。

5、 细胞培养上清或其它生物标本：请 2-8℃10，000×g 离心,20-30 分钟,上清即可用于检测或置于-20℃/-80℃下保存，避免反复冻融。

注意：

1、 **所有类型的标本，解冻后的都需要再次 2-8℃10,000×g 离心 20-30 分钟，取上清检测。**

2、 以上标本均需密封保存，4℃保存小于 1 周，-20℃不超过 1 个月，-80℃不超过 2 个月。

3、 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。

4、 样本中存在脂质、胶状物或沉淀会影响磁珠聚集沉降，从而影响检测结果，建议样本离心取上清后检测。

5、 标本使用前应缓慢均衡至室温，不应加热使之融解。

6、 在细胞培养时添加的动物血清含有高水平的未知因子，可能影响检测结果。

7、 **组织匀浆类样本和磁珠反应的时候，应室温（18-25℃）避光振荡反应 2 小时。**

[分析仪设置示例]

Luminex 200,FLEXMAP 3D	
分析体积	70μL
微球类型	MagPlex
磁珠量	50 粒/域
MFI 值	Median
DDGate	7500 to 15000

[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℃），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：标准品瓶加入标准品稀释液0.5mL作为STD1，盖好后室温静置大约10分钟，同时轻轻摇动（避免起泡），初始浓度见下表中“STD1”。准备6个稀释标准品的EP管，每个EP管中加入300μL的标准品稀释液，如下表所示依次4倍稀释成对应浓度。每次吸取100μL混合均匀的液体加入下一个EP管中，直至第6管。第7

管中仅加入标准品稀释液作为空白孔。为保证实验结果有效性，每次实验请使用新的标准品溶液。

项目	磁珠	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	STD7	浓度
NFkB	***	10	2.5	0.625	0.1563	0.0391	0.0098	0	ng/mL

3、 预混合磁珠使用前，请用涡旋混合仪轻柔震荡防止磁珠沉降。使用期间，预混合磁珠需避光。

4、 检测溶液 A 及检测溶液 B：检测溶液 A 及检测溶液 B 在使用前请短暂离心处理，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。检测溶液 B 配置时需避光。

5、 浓缩洗涤液：580mL 蒸馏水或去离子水加入 20mL 洗涤液（30×）稀释至 600mL 即为工作液浓度。

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。**每支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，直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、 若样本量不足，请在上样之前用 PBS 补充至所需的量。

4、 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。

5、 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。

6、 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。

7、 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。

8、 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 200μL 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。标准孔依次加入 100μL 不同浓度的标准品（见试剂准备 2）。

23603 W. Fernhurst Dr., Unit 2201, Katy, TX 77494, USA | 001-832-538-0970 | www.cloud-clone.us | mail@cloud-clone.us

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 10μL 混匀的磁珠悬液，酶标板加上覆膜，37℃酶标板振荡避光温育 1.5 小时，振动频率设置为 800rpm，振幅 2-4mm，防止磁珠沉降。**组织匀浆类样本和磁珠反应的时候，应室温（18-25℃）避光振荡反应 2 小时。**

3、 上磁力架，2 分钟后保持磁力情况下弃去液体，或磁力保持的状态下吸出板孔内液体，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℃酶标板振荡避光温育 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，磁力保持的状态下 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，倒出孔内的洗涤液，残留在孔内的少量液体不要吸干。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℃酶标板振荡避光温育 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，洗板 3 次，方法同步骤 5。

8、 去除磁力，每孔加鞘液 100μL，酶标板覆膜，37℃酶标板振荡避光 10min，振动频率设置为 800rpm，振幅 2-4mm，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。预混合磁珠和检测溶液 B 试剂准备和加样时需避光。

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。如果使用自动磁力洗板机，请在熟练使用后再用于正式实验。洗板时，为了避免磁珠丢失，洗涤的过程请保持酶标板在磁力架上，残留在孔内的少量液体不要吸干且不要在纸上拍打酶标板。

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。

6、 读数之前，将仪器进样针调节到距离酶标板孔底合适高度（两个垫片的高度）。

[实验原理]

将抗体包被于磁性微球表面，制成固相载体，向微孔中加入微球和标准品或标本，其中 NFkB 与连接于固相载体上的抗体结合，然后加入生物素化的抗体，在将未结合的生物素化抗体洗净后，加入 PE 标记的链霉亲和素，PE 被激发后，根据 MFI 值（Median Fluorescence Intensity）的大小和样品中的靶物质浓度呈正相关。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（六点图），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 R^2 值来定，以 R^2 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

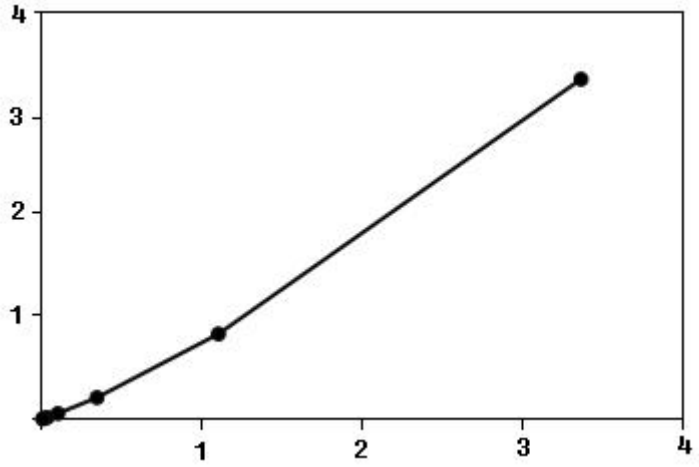
23603 W. Fernhurst Dr., Unit 2201, Katy, TX 77494, USA | 001-832-538-0970 | www.cloud-clone.us | mail@cloud-clone.us

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，实验者需要根据自已的实验建立标准曲线。



X 轴：MFI 值
Y 轴：标准品的浓度
检测试剂盒标准曲线

[检测范围]

NFkB：0.0098-10ng/mL.

[最低检测限]

NFkB：0.0033ng/mL.

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 NFkB，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。

[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、 每孔加入200μL分析缓冲液预湿，封闭震荡10min；

3、 加样（标准品、样本）100μL，磁珠10μL，37℃酶标板振荡避光孵育1.5小时*；

23603 W. Fernhurst Dr., Unit 2201, Katy, TX 77494, USA | 001-832-538-0970 | www.cloud-clone.us | mail@cloud-clone.us

4、 磁吸甩干，加检测溶液A 100μL，37℃酶标板振荡避光孵育1小时；

5、 磁吸洗板3次，弃液；

6、 加检测溶液B 100μL，37℃振动避光孵育30分钟；

7、 磁吸洗板3次，弃液；

8、 加鞘液100μL，37℃避光振荡10分钟后读数。

*注：**组织匀浆类样本和磁珠反应的时候，应室温（18-25℃）避光振荡反应2小时。**

[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，请务必按照说明书的要求存放试剂盒，并在有效日期前使用。

3、 不同批次的同一产品可能会有少许差别，如：检测限、灵敏度等，请严格按照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，避免因蛋白水解酶的干扰导致测值不准确。

6、 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。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。实验前请仔细阅读说明书并调试仪器。

7、 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。

8、 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。

9、 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。

10、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。

11、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。

12、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。

23603 W. Fernhurst Dr., Unit 2201, Katy, TX 77494, USA | 001-832-538-0970 | www.cloud-clone.us | mail@cloud-clone.us

[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
	磁珠丢失	确保洗板过程保持在磁力架上，不要在吸水纸上拍打
	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
珠子数量不足	样品中的脂质、胶体或沉淀物会导致珠粒聚集和沉淀	使用前去除脂质、胶体、沉淀物等，重新离心样品，取上清液检测
	在将磁珠放入板孔之前，磁珠没有完全悬浮	将磁珠完全悬浮后，再取磁珠加入96孔板孔
	洗涤过程中丢失磁珠	使用单通道或多通道移液管在距离磁铁最远处吸液，吸除洗涤缓冲液，或者保持磁力的状态下，连同磁力架一起翻转，倒出液体
	取数前磁珠未完全重悬	通过涡旋振荡或移液管吹打使珠子完全悬浮
	仪器进样针可能堵塞	机器的进样针需要清洁，如果需要，可以移除探头并进行超声波处理

23603 W. Fernhurst Dr., Unit 2201, Katy, TX 77494, USA | 001-832-538-0970 | www.cloud-clone.us | mail@cloud-clone.us