悬液芯片实验操作说明

一、开始准备

1、 将 assay buffer、wash buffer 和 sample diluent 放置到室温。其他试剂放到冰上。

2、 溶解样品。

3、 Bio-Plex system 需预热 30min。

4、 准备真空洗扳机

（1） 开机（右手后方）

（2） 洗扳机维护：

i. 按>键两下，显示 PROCEDURES，在 OK 处按回车键进入，有两种操作，Prime：只是洗针，Rinse：会将针泡在槽中。两种操作通过<和>键选择。

ii. Rinse 处，选择 OK，会有两种操作：Rinse Day 和 Rinse Night，通过<和>键选择。

iii. Rinse Day，选择 OK，Channel 1 装水，选择 OK，Volume，通过＋和－改变体积，一般用 30 mL，选择 OK，开始运行。等到盖子抬起时，可以观察是否 8 根针都往外喷水。选择 END 结束这次 Rinse。如果有针未出水，可以再进行 Prime 或者 Rinse。

Rinse：是在 Prime（冲洗针和管路）后，将针下压，浸到水槽中。

（3） 正式洗板之前，需要将 channel 1 的管路从绿筒上拔下（拔下后将管子甩一下，避免前端管口的水混入 wash buffer），插入 wash buffer 瓶中，进行 Prime。体积可设为 15 ml。

5、 （）

二、样品稀释

1、 血清和血浆用试剂盒带的 sample diluent 稀释，稀释倍数 1:3 或者 1:4。

2、 细胞培养液不用稀释。

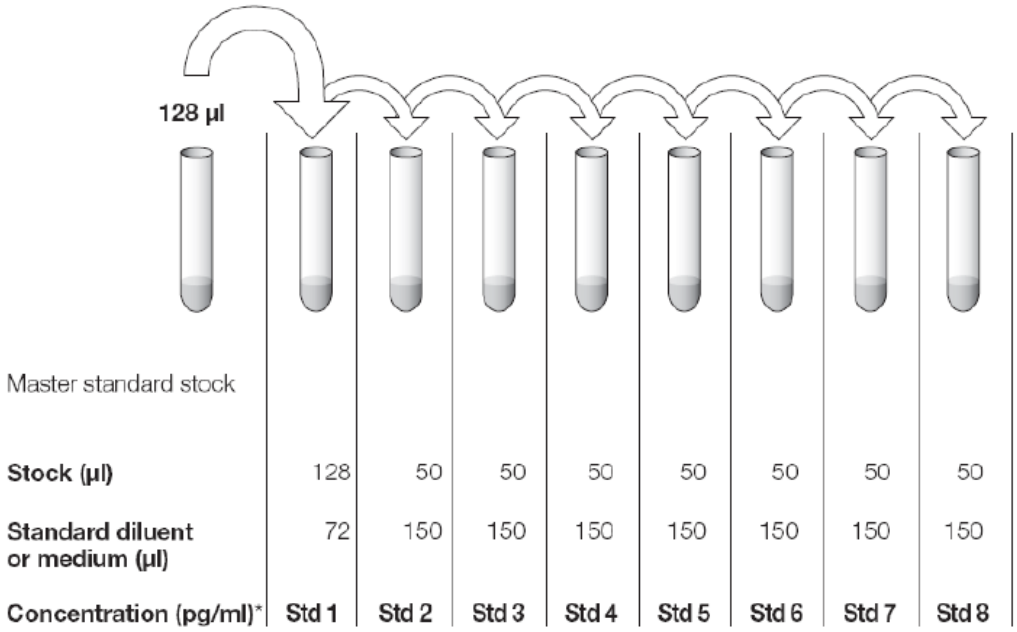
三、标准品稀释

1、 每管冻干标准品加入 500ul 标准品稀释液（standard diluent），作为标准液储存液。振荡 5 秒钟后冰浴 30min 使用。标准品稀释液含蛋白，可以作为除细胞因子之外的其他成分的 blank。

如果同时检测两种试剂盒，则两个试剂盒的标准品也要混合，可以每个标准品加 250ul，再合到一起。或者一个标准品用 500ul 稀释后再加入另一个标准品。

2、 标准品比例稀释

根据不同跨度灵敏度范围准备工作曲线样品，准备好小离心管，标号，然后分别按下图进行稀释。一般制备 S1－S10，另外再加一个 blank，共 11 个浓度梯度。可以先将 Standard diluent 分装到各个小管，第一管 72 ul，其余取 150 ul。取液体之前先用移液枪吹打样品。整个过程需要将样品放到冰上，直到使用。



3、 将标准品储存液振荡后，加入各个小管。（标准品储存液 500ul 取了 128ul，剩余 372ul，分成 2 管，放入－80 度冰箱保存。）

四、微球稀释

1、 先将微球管中速 vortex 振荡 30 秒，再用移液器吹匀，切忌不可离心。冰浴，保存直到使用。（下次用 assay buffer 将管子冲洗干净）

2、 根据检测所用的孔数计算所需微球体积和稀释液体积。

人和小鼠细胞因子 group I 和 II			
孔数	10×beads，ul	Assay buffer，ul	Total volume,ul
96	575	5175	5750
小鼠细胞因子 group III 和大鼠细胞因子 groupI			
孔数	20×beads，ul	Assay buffer，ul	Total volume,ul
96	288	5472	5760

3、 将稀释后的微球液体（1×）振荡 10－20 秒，加入移液槽（可以是用 PE 手套垫在

一个盒子中）中，用排枪每个孔 50 ul 加入检测板中。加完后用手轻拍，左右振荡检测板，使液体覆盖每个孔。

4、 将检测板放入洗扳机，左右摇晃几下，保证微球被底部磁体吸到管底两侧。Program，选择 OK；Start，选择 OK；Run 1，洗 2 次，选择 OK；显示 12 个 S，对应检测板的 12 行（板为竖放），如果有几行没有样品，需要将光标移到相依位置，选择 Chg 改为 N，选择 OK。

5、 将检测板用自带的膜封上，也可用 Q-PCR 的膜。避光保存。

五、开始上样检测

1、 将样品、标准品和 blank 振荡后每孔加 50ul，膜封上板后避光放入振荡器室温孵育 45min。先 1100rpm 将样品混匀，再改成 850rpm。在次过程中可以稀释检测抗体（detection Abs）。

2、 振荡检测抗体 5 秒，用稀释液稀释。

孔数	10×检测抗体，ul	Detection Abs Diluent，ul	总体积，ul
96	300	2700	3000

3、 孵育结束后放入洗扳机，Program，选择 OK；Start，选择 OK；Run 2，洗 3 次，选择 OK；显示 12 个 S，对应检测板的 12 行（板为竖放），如果有几行没有样品，需要将光标移到相依位置，选择 Chg 改为 N，选择 OK。100 ul wah buffer 洗板，共三次。

4、 振荡 1×的检测抗体，每孔加 25ul。850rpm 孵育 30min。同时，Bio-Plex 软件设定 protocol，输入 S1 的浓度。

5、 在孵育同时，振荡 100×SA-PE 5 秒，用手甩下液体，稀释成 1×。

孔数	100×SA-PE，ul	Assay buffer，ul	总体积，ul
96	60	5940	6000

6、 孵育结束后放入洗扳机，Program，选择 OK；Start，选择 OK；Run 2，洗 3 次，选择 OK；显示 12 个 S，对应检测板的 12 行（板为竖放），如果有几行没有样品，需要将光标移到相依位置，选择 Chg 改为 N，选择 OK。100 ul wah buffer 洗板，共三次。

7、 振荡 1×SA-PE，每孔加 50 ul。850rpm 孵育 10min。

8、 孵育结束后放入洗扳机，Program，选择 OK；Start，选择 OK；Run 2，洗 3 次，选

择 OK；显示 12 个 S，对应检测板的 12 行（板为竖放），如果有几行没有样品，需要将光标移到相依位置，选择 Chg 改为 N，选择 OK。100 ul wah buffer 洗板，共三次。

9、 用 125ul 的 assay buffer 重新悬浮，850rpm 振荡 30 秒。

六、开机检测

1、 start up：DI H2O 和 70%异丙醇。

2、 warm up：预热激光器半小时。可在 start up 之前或之后，在 warm up 过程中其他操作不能动。

3、 calibration：CAL 1 和 CAL 2 及水。在 warm up 完成后才可进行。

4、 New protocol：选择试剂盒（可以挑其中几个因子检测），设置每孔的名字（标准品中 S4-S8 可重复），输入标准品浓度

5、 点击 start，保存结果。

6、 点击 OK，开始检测。可以在检测过程中 stop，振荡检测板几分钟，以免检测时间过长，导致微球沉淀。由于已经点了 rerun，所以可以接着前面的继续检测。

7、 关机：用水和 10%的次氯酸钠洗。

七、结果分析

1、 raw data：在读板界面下方的数据

2、 response table（界面左侧）：

（1）OOR<：表示读数太小，无法读出

3、 standard curve：读完后软件会自动优化，定 2 个检测范围，其中之内的点定量比较好，换算出来的浓度列在 Cons in Range 中，Obs Range 中的数据加*，表示点出范围不多，软件尽量算出一个值供参考。如果 Obs Rang 都算不出来，只能参考 FI-Bk gd，实在不行只能参考 FI。

4、 点击分组显示，可以看出每个孔的值。

5、 标准曲线做的好不好，可以看重复孔的 Std Dev（标准误），%CV 值（变异系数）在 10%以内也不错。有些因子的%CV 就会高一些。磷酸化的%CV 在 15%左右。

6、 在工作栏点击打勾的图标，可以添加样品的注释。

7、 Outlier 可以把标准曲线中比较平的点打勾从标准曲线计算中去掉。自己优化标准曲线。在 standard curve 窗口，可以在标准曲线的点上，点击右键确定是加上或去除该点。定量的线性范围不会根据加入更多的点而变的范围更大。检测不到的样品点

的浓度可以说是低于最低检测线性范围。

8、 Exp Conc（期望值）：填入的标准品的浓度值

9、 （Obs-Exp）/100：回收率，是实际测的标准品的值与期望值之间的差距，100%最好

10、 导出 excel：选第二种导出格式

11、 OOR<是低于检测限，OOR>是高于检测限，带*的意思是在检测范围内，但是不在线性定量范围，FI 是原始荧光值，FI-Bkgd 是荧光值减掉背景荧光值，您需要的是 Conc In Range，是在标准曲线线性范围内的浓度，这个结果检测不到，可以用 Obs Conc，也是浓度，单位一般是 pg/ml,这两个都没结果才考虑 FI-Bkgd，FI-Bkgd 为负说明检测浓度低于背景无法计算，最后才考虑用 FI。如果用到 FI 和 FI-Bkgd 结果，就不是定量实验了，只能定性。

八、操作流程及问题解决

1、 换针

将前面的塑料板拿下，白色塑料块拔出，先拧松固定针高度的螺丝，向上提高一下针的高度，在固定针。拧开连接针的细管的接头，将针从下向上退出，拿出新针从上向下安装，连接接头，注意将细管拨到右侧的槽中，装上（使劲）白色塑料块。

2、 校针的高度

软件点击 Ajust Sample Needles，进入调整页面。打开放微孔板的门（eject），放入微孔板，点击软件回缩微孔板(retract plate)，用手拦住白色的门不要关上。点软件上的 down，针深入 MCV 板的孔中，通过拧松正面的螺丝，肉眼观察，针不要完全接触板底。再点击 up，后 down，肉眼再观察，无问题，点 save。每次换针都需调节。换下的堵针超声 10－20 min

3、

九、流程

1、 激光器 4 小时自动关闭，需要重新 calibration

2、 Start Up  ：冲管路，启动机器（水和 70%异丙醇，打开废液瓶盖）

3、 激光器预热 warm up  ：Start up 结束后，点击工具栏上的 按钮，将 MCV 板取出，然后开始进行仪器预热，点击工具栏上的 预热按钮，仪器开

始自动预热，一般预热 30min。

4、 Calibration ：预热结束后进行仪器校正，点击工具栏上的校正按钮。确认试剂瓶上的批号和软件上的一样，点击 ok，根据提示加入试剂，然后将 MCV 板推入仪器，按 OK 开始进行仪器校正。

5、 注意：Calibrate kit 中的试剂 CAL1 和 CAL2 在加入前必须从 2-8℃恢复到室温，并进行漩涡混合 30 秒以上才能使用，每孔加入 5 滴，DI 水加入 3.5mL。

6、 Validation：每月进行一次。View→Validation Log 导出 Validation 的结果。

7、 关机

(1) 如果第一块板读完还要读第二块板，则需要先点击工具栏的 Wash between plate 按钮 ，按照弹出窗口的提示在 MCV 板上加入相应的试剂，然后点 OK 开始清洗。

如果当天读板结束，要关机，则点击工具栏上的 Shut down 按钮 ，仍按照屏幕提示进行操作（水和 10%次氯酸钠），Shutdown 结束后，激光关闭，先关闭电脑的 Bio-Plex Manager 程序，然后关闭机器电源。

(2) 可以用配套的另一个瓶子装水，替换管路中的鞘液，或者 Instrument→Additional Function→Drain，将 Bio-Plex HTF 泵中的鞘液抽干，连接鞘液的管路放入水瓶中。Bio-Plex HTF 无水时，按 Prime 可上水。

(3)

8、 洗扳机