

*PRODUCT INFORMATION AND MANUAL*

# **Mouse IFN- $\gamma$ precoated ELISPOT kit**

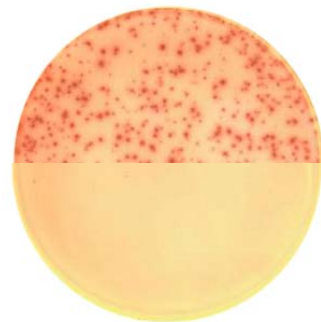
Cat# : DKW22-2000-048/ DKW22-2000-096

**For research use only.**

**Not for diagnostic or therapeutic procedures**

**(1301)**

**Mouse IFN- $\gamma$   
DKW22-2000**



达优®系列产品

# 目录

产品简介： .....	2
技术原理： .....	3
试剂盒提供的试剂、规格： .....	4
试剂的配制： .....	5
检测操作： .....	6
操作相关指导 .....	8
试剂盒的保存： .....	9
常见问题及解决方案： .....	10
参考文献： .....	11
预包被 ELISPOT 试剂盒系列产品.....	12
ELISPOT 试剂盒相关产品 .....	13
ELISPOT 试剂盒辅助试剂 .....	14
实验记录一： .....	15
实验记录二： .....	17

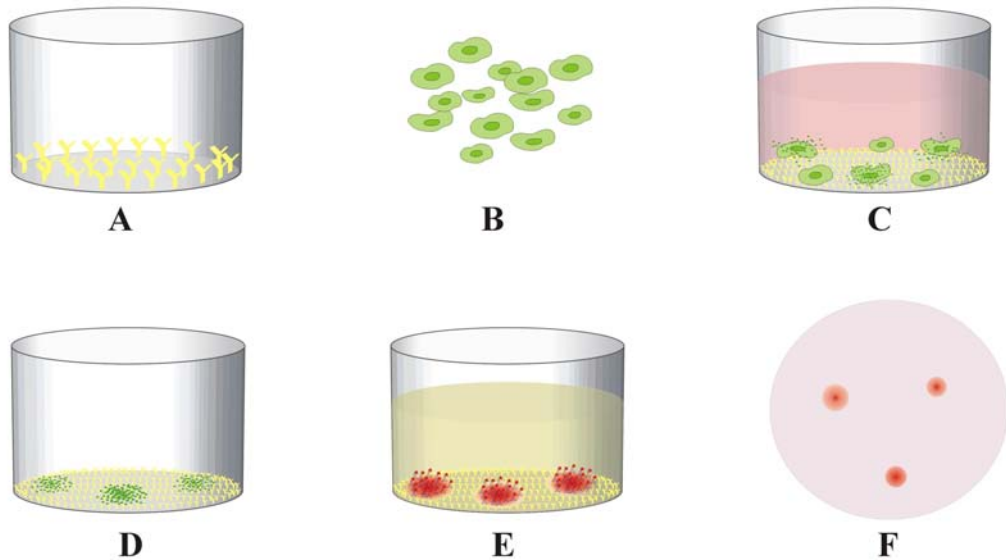
## 产品简介：

酶联免疫斑点（ELISPOT）技术是当今世界上检测生物体细胞免疫水平的最佳技术。它集高灵敏度、高可信度、高通量、单细胞水平、功能性检测与低成本等诸多优点于一身，在国内外免疫学界获得了广泛的应用，成为主流免疫学检测技术之一。

达科为公司生产的达优<sup>®</sup>系列 ELISPOT 预包被试剂盒采用原装进口高亲和力高效价抗体对，经预包被 PVDF 板、低温冷冻干燥、真空密封包装等工艺流程制备。成品 PVDF 板上预包被的抗体分布均匀、效价稳定，2~8℃可存放 12 个月。

达优<sup>®</sup>系列预包被 ELISPOT 试剂盒使实验检测时间从 3 天缩短为 2 天，大幅度减少无菌操作的实验步骤，减轻实验者的劳动强度和减少污染的机会。使得实验者能够轻松、高效地完成复杂的 ELISPOT 检测实验。

## 技术原理



A.用抗 IFN- $\gamma$  的单克隆抗体包被在检测孔的底部。

B.分离待检测样本的淋巴细胞。

C.将待测细胞放入检测孔中培养约 20 小时，同时加入特异抗原。在培养期间，对特异抗原有反应的 T 淋巴细胞就会被激活，开始分泌特定的细胞因子（如 IFN- $\gamma$ ），这些细胞因子同时被板底的单克隆抗体捕获；对特异抗原没有反应的细胞则不受刺激，也不分泌特定的细胞因子（如 IFN- $\gamma$ ）。

D.移出细胞，板底留下细胞因子的潜在影像。

E.这种潜在的影像可以通过酶联显色的方式变成真正的影像——斑点。

F.每一个斑点代表了一个对特异抗原有反应的特异性 T 淋巴细胞。斑点的数目多少就反映了样本的细胞免疫的识别状态：斑点多说明免疫识别状态好，斑点少说明免疫识别状态差或者出现免疫耐受。

## 试剂盒提供的试剂、规格

名 称	规格 (48T)	规格 (96T)
Biotinylate antibody	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L
Streptavidin-HRP	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L
Dilution buffer R (1 $\times$ )	10mL	10mL $\times$ 2
Washing buffer (50 $\times$ )	10mL	10mL
AEC dilution	10mL	10mL
AEC solution I (20 $\times$ )	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L
AEC solution II (20 $\times$ )	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L
AEC solution III (200 $\times$ )	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L
阳性刺激剂	50T	50T
预包被 PVDF 板	1 块	1 块

## 需要实验者自行准备的试剂与仪器

1. RPMI-1640 基本培养基（需要添加双抗，不需添加血清）
2. 无血清培养基（完全培养基，即用型）
3. 超净工作台
4. CO<sub>2</sub> 细胞培养箱
5. 微量移液器及配套 Tip
6. 8 通道微量移液器
7. 0.5mL, 1.5mL EP 管
8. Biosys Bioreader 自动读板仪

## 试剂的配制

1. **Washing buffer (50×)**: 用去离子水稀释(1:50), 制成 **1× Washing buffer** 备用。
2. 生物素标记的抗体 (Biotinylated antibody, Secondary antibody): 用 **Dilution buffer R (1×)** 稀释(1:100), 即为工作液。
3. 酶联亲和素 (Streptavidin-HRP): **Dilution buffer R (1×)** 稀释(1:100), 即为工作液。
4. **AEC 显色液**: 在洁净的容器内将 **AEC dilution**、**AEC solution I (20×)**、**AEC solution II (20×)**、**AEC solution III (200×)** 按照 180:10:10:1 的比例混匀, 即为工作液。可参见下表。AEC 显色液工作液室温下的半衰期约 30 分钟, 使用时现用现配。

总体积	AEC dilution	AEC Solution I (20×)	AEC Solution II (20×)	AEC Solution III (200×)
<b>3mL</b>	2.7mL	150μL	150μL	15μL
<b>5mL</b>	4.5mL	250μL	250μL	25μL
<b>8mL</b>	7.2mL	400μL	400μL	40μL
<b>10mL</b>	9mL	500μL	500μL	50μL

5. **无血清培养基**: 推荐使用 ELISPOT 无血清培养基。如果没有, 可用含 5-10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基代替。
6. 阳性刺激剂按标签重悬即为工作液。

## 检测操作

第一天：接种细胞，加入刺激物，培养  
(严格注意无菌操作)

1. 预包被板的活化：每孔加入 200 $\mu$ L 无血清培养基或者 RPMI-1640 培养基，室温静置 5-10 分钟后将其扣出。
2. 加入细胞悬液：将调整好浓度的细胞悬液加入各实验孔，100 $\mu$ L/well。  
正对照孔：细胞浓度可采用  $1\times 10^5$  cells/well；  
负对照孔：细胞浓度可采用  $1\times 10^5$  cells/well；  
背景负对照：加入重悬细胞用培养基（无血清培养基或含胎牛血清的 RPMI-1640 培养基）；  
实验孔：样品细胞浓度由实验者根据实验自行调整。
3. 加入刺激物：10 $\mu$ L/well，具体如下：  
正对照孔：加入阳性刺激剂工作液。  
负对照孔【含背景负对照孔】：加入无血清培养基（或重悬细胞用培养基）；  
实验孔：加入实验者自己的刺激物（用无血清培养基或者 RPMI 1640 配制成  $10\times$  终浓度）。
4. 孵育：所有样品和刺激物加完后，盖好板盖。放入 37 $^{\circ}$ C，5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养 16-20 小时。

## 第二天：培养后操作（不再需要无菌操作）

1. **裂解细胞**：倾倒孔内细胞及培养基。加冰冷的去离子水，200 $\mu$ L/well，4 $^{\circ}$ C冰箱放置 10 分钟低渗裂解细胞。
2. **洗板**：倾倒孔内液体，**1 $\times$ Washing buffer**，200 $\mu$ L/well，洗涤 5-7 次。每次停留 30-60 秒。最后一次，在吸水纸上扣干。
3. **检测抗体孵育**：将稀释好的生物素标记的抗体工作液加入各实验孔，100 $\mu$ L/well。37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。
4. **洗板**：倾倒孔内液体，**1 $\times$ Washing buffer**，200 $\mu$ L/well，洗涤 5 次。每次停留 30-60 秒。最后一次，在吸水纸上扣干。
5. **酶联亲和素孵育**：将稀释好的酶标亲和素工作液加入各实验孔，100 $\mu$ L/well。37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。
6. **洗板**：倾倒孔内液体，**1 $\times$ Washing buffer**，200 $\mu$ L/well，洗涤 5 次。每次停留 30-60 秒。最后一次，在吸水纸上扣干。
7. **显色**：将现配的 **AEC 显色液**工作液加入各实验孔，100 $\mu$ L/well。室温避光静置 15-45 分钟（在 20 -25 $^{\circ}$ C，显色 25 分钟较合适）。若室温低于 20 $^{\circ}$ C，建议在 37 $^{\circ}$ C 孵箱做显色，每隔 5-10 分钟检查一次。
8. **终止显色**：倾倒孔内液体，揭开板底座，用去离子水/自来水洗涤正反面及底座 3-5 遍，终止显色。将板放置在室温阴凉处，待其自然晾干后合上底座。
9. **ELISPOT 板斑点计数**，并记录斑点的各种参数，做统计分析。



## 操作相关指导

### 关于洗涤：

用排枪每孔加入 200-300 $\mu$ L 洗涤缓冲液，多了易溢出。加入洗涤缓冲液之后浸泡 30-60 秒。然后扣出洗涤液。注意：所有从孔中移出液体的步骤均需用力甩出或者扣出，勿用枪头去吸，以免碰刮、损伤到膜。洗涤步骤的最后一次操作需要在吸水纸上拍干。吸水纸最好采用进口棉纸，强度高，不掉屑，吸水量大，使用前需要高压灭菌。不充分的洗涤将加重膜背景，对斑点计数造成干扰。显色前请启开底座挡板，清除底座积液，防止膜背景加重。

### 注意：

- 1 Washing buffer (50 $\times$ )** 4 $^{\circ}$ C 存放后出现结晶析出为正常现象，用前半小时置于 37 $^{\circ}$ C 轻摇混匀可消除结晶，对实验结果无影响。
- 2 Dilution buffer R(1 $\times$ ) / Dilution buffer R(10 $\times$ )** 有少量沉淀为蛋白正常饱和析出，用前静置沉降，取用上清即可，不影响实验结果。

## 试剂盒的保存

**4°C 保存可稳定 12 个月。**

**开启后一次性用完。**

## 常见问题及解决方案

现象	原因分析	改进措施
膜着色较重，背景较深	<ol style="list-style-type: none"> <li>1 洗板不彻底；</li> <li>2 PVDF 膜没有干透，底座内残留液体</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1 提高洗板次数，保证每次浸泡 30 秒；</li> <li>2 PVDF 膜干透后再读板。</li> </ol>
斑点形状不规则，成团严重	<ol style="list-style-type: none"> <li>1 细胞破碎</li> <li>2 细胞成团</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1 优化淋巴细胞分离液，坚持细胞活性计数，确保细胞活性；</li> <li>2 细胞悬液充分混匀，确保呈单细胞状态；</li> </ol>
阳性对照斑点着色淡，较模糊，	<ol style="list-style-type: none"> <li>1 酶活力下降</li> <li>2 显色试剂温度低，出现氧化现象</li> <li>3 刺激物效价低</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1 提高酶浓度；</li> <li>2 显色试剂使用前平衡到室温，勿使用已出现氧化沉淀的试剂；</li> <li>3 提高刺激物浓度</li> </ol>
斑点大小不一，颜色深浅差异大	阳性对照出现此现象时判为细胞状态参差不齐，存活率低	<ol style="list-style-type: none"> <li>1 优化淋巴细胞分离液，坚持细胞活性计数，确保细胞活性；</li> <li>2 加强细胞洗涤，去除死细胞；</li> </ol>
	阳性对照正常时判为刺激物特异性程度低	<ol style="list-style-type: none"> <li>1 更换刺激物</li> </ol>
斑点较少	阳性对照正常时判断为刺激物特异性问题，正常细胞应答水平低	<ol style="list-style-type: none"> <li>1 改变刺激浓度；</li> <li>2 提高试验孔的细胞总数；</li> </ol>
	阳性对照斑点少时判断为加入的存活细胞数太少	<ol style="list-style-type: none"> <li>1 增加细胞的总量；</li> <li>2 进行活性计数，提高细胞活性；</li> </ol>
斑点太多，影响计数	细胞数过大	<ol style="list-style-type: none"> <li>1 稀释细胞，确定最佳浓度</li> </ol>

## 参考文献

- 1.刘光泽,等.[J]中国免疫学杂志,2005,21(5):367-368
- 2.孙 雯,等.[J]中华器官移植杂志,2005,26(5):265-268
- 3.张宜俊,等.[J]检验医学,2006,21(1):8-11
- 4.周明奎,等.[J]中国免疫学杂志,2007,12
- 5.肖伟玲,等.[J]细胞与分子免疫学杂志,2007,23(12):1130-1132,1135
- 6.许丽锋,等.[J]中国生物制品学杂志,2007,20(12):907-909
- 7.董富敏,等.[J]现代食品与药品杂志,2007,17(4):3-5
- 8.刘光泽,等.[J]中国病理生理杂志,2007,23(1):99-102
- 9.袁有成,等.[J]中国药学杂志,2007,42卷(13):998-1002
- 10.张春涛,等.[J]中华微生物学和免疫学杂志,2007;27(11):1059-1060
- 11.Xian-Hua Wang, et.al.[J]World J Gastroenterol, 2005; 11(36): 5614-5620
- 12.Xu-Dong Tang, et.al.[J]Cancer Research,2008,68(5):1529-1537
- 13.忻亚娟 等. 冻干甲型肝炎减毒活疫苗诱导的人体特异性免疫应答[J]. 中国疫苗和免疫. 2009,14(3): 246-249
- 14.赵小霞 等. 大肠杆菌麦芽糖结合蛋白(MBP) 诱导小鼠Th1 细胞的活化作用[J]. 中国免疫学杂志. 2009,25(6): 504-507
- 15.张晓光 等. 含H5N1-HA 基因重组腺病毒疫苗的构建及其诱导免疫应答的初步探讨[J]. 中华实验和临床病毒学杂志. 2009,23(2): 97-99
- 16.南文龙 等. 人-禽双价流感新型DNA 疫苗构建及免疫保护实验研究[J]. 中国科学C辑:生命科学. 2009,39(6): 534-541
- 17.李 丽 等. 荷S-180 移植瘤小鼠血清干扰素 $\gamma$  含量的变化及免疫调节药物的干预作用[J]. 南方医科大学学报. 2008,28(1): 65-68

## 预包被 ELISPOT 试剂盒系列产品

货 号	名 称	规 格
DKW22-1000-048	Human IFN- $\gamma$ precoated ELISPOT kit	48 T
DKW22-1000-096		96 T
DKW22-1000-500		5 $\times$ 96T
DKW22-1000-096(strips)	Human IFN- $\gamma$ precoated ELISPOT kit (板条可拆卸)	96 T
DKW22-1000-500(strips)		5 $\times$ 96T
DKW22-1020-048	Human IL-2 precoated ELISPOT kit	48 T
DKW22-1020-096		96 T
DKW22-1020-500		5 $\times$ 96T
DKW22-1040-048	Human IFN-4 precoated ELISPOT kit	48 T
DKW22-1040-096		96 T
DKW22-1040-500		5 $\times$ 96T
DKW22-2000-048	Mouse IFN- $\gamma$ precoated ELISPOT kit	48 T
DKW22-2000-096		96 T
DKW22-2000-500		5 $\times$ 96T
DKW22-2040-048	Mouse IFN-4 precoated ELISPOT kit	48 T
DKW22-2040-096		96 T
DKW22-2040-500		5 $\times$ 96T
DKWHBV-1001-048	HBV C IFN- $\gamma$ ELISPOT kit	48T
DKWHBV-1001-096		96T
DKWTB-1002-048	TB IFN- $\gamma$ ELISPOT kit	48T
DKWTB-1002-096		96T
DKWHBV-1001-096(strips)	HBV C IFN- $\gamma$ ELISPOT kit (板条可拆卸)	96T
DKWTB-1002-096(strips)	TB IFN- $\gamma$ ELISPOT kit (板条可拆卸)	96T

## ELISPOT 试剂盒相关产品

### 1. 淋巴细胞分离液

货 号	名 称	规 格
DKW-LST-015	Human Lymphocyte Separation Tube	24 支/盒
DKW-LST-050	人淋巴细胞分离管	10 支/盒
DKW-LSH-0100	E Human Lymphocyte Separation Medium	100mL
DKW-LSH-0400	人淋巴细胞分离液	4×100mL
DKW33-R0100	Mouse 1× Lymphocyte Separation Medium	100mL
DKW33-R0400	小鼠淋巴细胞分离液	4×100mL

### 2. 达优®冻存试剂盒

货 号	名 称	规 格
UH-M1002-050	达优® Freezing kit (达优®冻存试剂盒)	50mL

### 3. ELISPOT 无血清培养基

货 号	名 称	规 格
DKW34-EU0100	Serum-Free Medium for ELISPOT, universal	100mL
DKW34-EU0400	(广谱型)	4×100mL
DKW34-EH0100	Serum-Free Medium for ELISPOT, human	100mL
DKW34-EH0400	(人类)	4×100mL

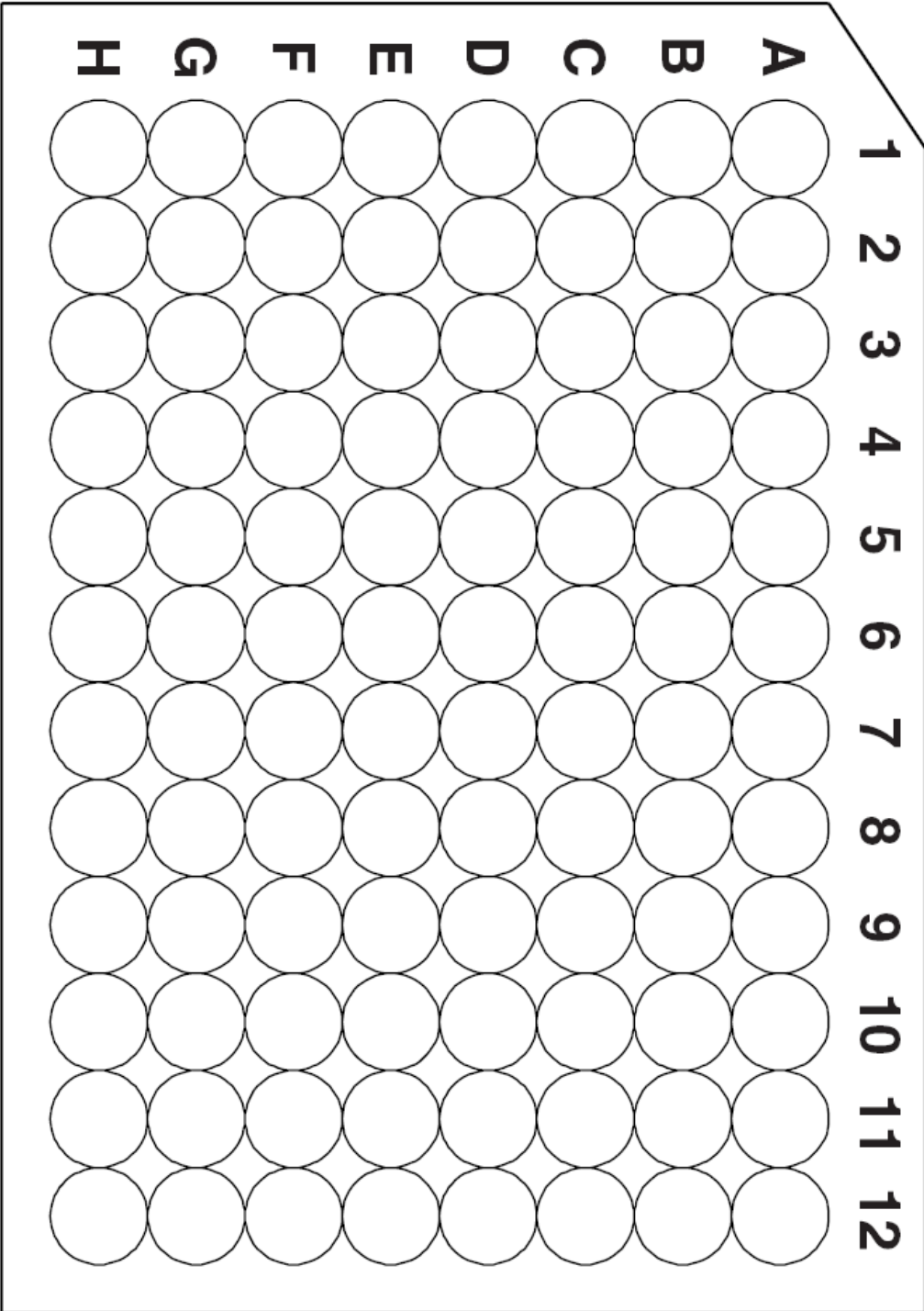
## ELISPOT 试剂盒辅助试剂

货 号	名 称	规 格
DKW-F010-1	全套人 ELISPOT 辅助试剂盒	10×96 T
DKW-F010-2	全套小鼠 ELISPOT 辅助试剂盒	10×96 T
DKW-STD-001	酶联免疫斑点法 ELISPOT 标准品 试剂盒	50T
DKW-STD-F	F 肽	10T
DKW-ST-PI	PMA / Ionomycine	50T
DKW-ST-P	PHA	50T
DKW01-0010	PVDF coating buffer	5×96 T
DKW02-0001	AEC coloring system	96 T
DKW02-0010		10×96 T

# 实验记录一

	A	B	C	D	E	F	G	H
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								
11								
12								







---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---