

PRODUCT INFORMATION AND MANUAL

Human TB IFN- γ precoated ELISPOT kit

结核杆菌感染 T 细胞酶联免疫斑点诊断试剂盒

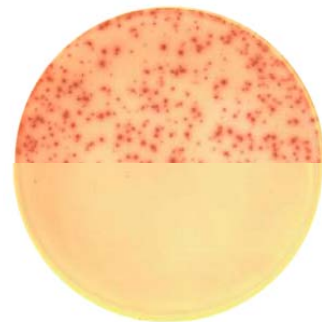
Cat# :DKWTB-1002-096(strips)

For research use only.

Not for diagnostic or therapeutic procedures

(1301)

**Human TB IFN- γ
DKWTB-1002
(strips)**



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
结果判断相关指导	8
贮存条件及警告性说明：	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：	16
实验记录二：	18

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。

本试剂盒通过体外检测人外周血样本中结核杆菌（MTB）特异的效应 T 淋巴细胞在结核杆菌特异抗原多肽刺激后分泌的 γ -干扰素，用于结核杆菌感染的诊断。结核杆菌感染主要引起的是细胞介导的免疫应答。作为免疫应答的一部分，T 淋巴细胞接受结核杆菌抗原刺激成为活化的效应 T 细胞。受到结核杆菌特异抗原刺激后，这些活化的效应 T 淋巴细胞，包括 CD4 和 CD8T 细胞，将分泌 γ -干扰素。试剂盒内使用的结核杆菌特异抗原多肽增加了测试的特异性并避免了与卡介苗（BCG）接种以及其它环境分枝杆菌感染的交叉反应。两种优化的混合多肽抗原有效提高了反应的灵敏度。

技术原理

结核杆菌感染 T 细胞斑点试剂是利用结核杆菌感染者外周血中存在结核杆菌特异的活化 T 淋巴细胞，这些淋巴细胞在受到结核杆菌特异抗原刺激后分泌 γ -干扰素而设计的 T 细胞免疫斑点实验。

外周血单核细胞、结核杆菌特异的混合抗原 A/混合的抗原 B 或对照试剂一起加入预包被抗 γ -干扰素抗体的微孔培养板进行培养。当外周血单核细胞中存在针对结核杆菌的效应 T 淋巴细胞时，培养液中加入的结核杆菌特异混合抗原多肽 A 和 B 将刺激这些效应 T 淋巴细胞分泌 γ -干扰素。分泌的 γ -干扰素将被微孔板上包被的抗 γ -干扰素抗体捕获，再次加入的生物素标记的检测抗体将针对 γ -干扰素不同的表位与被捕获的 γ -干扰素结合，辣根过氧化物酶通过亲和素与生物素的高特异性结合滞留在微孔板表面，显色底物溶液在反应部位被酶分解形成不溶性色素沉淀斑点。每一个斑点代表一个 γ -干扰素分泌细胞（结核特异的效应 T 淋巴细胞）。通过对斑点进行计数可以推测体内是否存在对结核杆菌反应的效应 T 细胞，从而对结核杆菌感染进行辅助诊断。

试剂盒提供的试剂、规格

名 称	规格 (96T)
Biotinylate antibody	50 μ L \times 2
Streptavidin-HRP	50 μ L \times 2
Dilution buffer R (1 \times)	10mL \times 2
结核杆菌特异混合多肽 A	320 μ L
结核杆菌特异混合多肽 B	320 μ L
PHA(冻干粉)	50T
Washing buffer (50 \times)	10mL
AEC dilution (即用型)	10mL
AEC solution I (20 \times)	500 μ L
AEC solution II (20 \times)	500 μ L
AEC solution III (200 \times)	50 μ L
预包被 PVDF 板【板条可拆卸】	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. CO₂ 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×)
1mL	0.9mL	50μL	50μL	5μL
2mL	1.8mL	100μL	100μL	10μL
3mL	2.7mL	150μL	150μL	15μL
4mL	3.6mL	200μL	200μL	20μL
5mL	4.5mL	250μL	250μL	25μL
8mL	7.2mL	400μL	400μL	40μL
10mL	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。

检测操作

样本采集:

无菌注射器抽取待测样本外周静脉血 5mL，加入含肝素或者 EDTA 抗凝采血管；或使用 5mL 含肝素或 9mL EDTA 抗凝真空采血管直接采集。样本采集后可放置室温 3-4 小时，请勿置于冷冻或冷藏室。

外周单个核细胞分离:

Lymphocyte Separation Medium 法：取 5mL 新鲜外周血（肝素或 EDTA 抗凝），加入等体积无菌 RPMI 1640 不完全培养液混匀，按稀释后血液：Lymphocyte Separation Medium =2:1 加在 Lymphocyte Separation Medium 上层。注意不要与 Lymphocyte Separation Medium 混合，放入水平离心机，25℃，800g 离心 15 分钟。

Lymphocyte Separation tube 法：取 5mL 新鲜外周血（肝素或 EDTA 抗凝），不经稀释直接加入分离管。放入离心机，25℃，800g 离心 10 分钟【注意事项详见分离管使用说明书】。

外周血单个核细胞收集与计数:

离心后，将形成云雾状的单个核细胞层，用吸管（或移液加样器）将含外周血单个核细胞液体层转移到无菌 15mL 尖底离心管，加入 10mL RPMI 1640（或者无血清培养液）25℃，250g 离心 10 分钟。小心弃去上层液体，将细胞沉淀重悬于 1mL 无血清培养液。将混匀的细胞悬液稀释后进行计数，根据计数结果用无血清培养液调节细胞浓度为 $2.5 \times 10^6/\text{mL}$ 。

ELISPOT 检测步骤

- 1. 板的活化：** 每孔加入 200 μ L 无血清培养基或 RPMI-1640 培养基，室温静置 5-10 分钟，倾倒。
- 2. 加入细胞悬液：** 按照实验安排，每个测试样本需 4 孔，加入不同样本细胞，100 μ L/well。
阴性对照：每孔加入 10 μ L 无血清培养基。
阳性对照：每孔加入 10 μ L PHA，试剂配制详见标签。
测试孔 A：每孔加入 10 μ L 结核杆菌特异混合多肽 A。
测试孔 B：每孔加入 10 μ L 结核杆菌特异混合多肽 B。
- 3. 孵育：** 当加完所有的样品之后，盖上班盖，放入 37 $^{\circ}$ C，5%CO₂ 培养箱培养 16-20 小时。
- 4. 裂解细胞：** 倾倒孔内细胞及培养基。加冰冷的去离子水，200 μ L/well，4 $^{\circ}$ C 冰箱放置 10 分钟低渗裂解细胞。
- 5. 洗板：** 倾倒孔内液体，每孔用 200 μ L 1 \times Washing buffer 洗涤 5 次，每次 30-60 秒。最后一次，在吸水纸上扣干。
- 6. 检测抗体孵育：** 每孔加入 100 μ L 稀释好的生物素标记的抗体，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。
- 7. 洗板：** 倾倒孔内液体，每孔用 200 μ L 1 \times Washing buffer 洗涤 5 次，每次 30-60 秒。最后一次，在吸水纸上扣干。
- 8. 亲和素孵育：** 加入 100 μ L 稀释好的酶标亲和素，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。
- 9. 洗板：** 倾倒孔内液体，每孔用 200 μ L 1 \times Washing buffer 洗涤 5 次，每次 30-60 秒。最后一次，在吸水纸上扣干。
- 10. 显色：** 配好 AEC 显色液。每孔加入 100 μ L 的显色液，室温避光静置 15-45 分钟（在 20 -25 $^{\circ}$ C，显色 25 分钟较合适）。
- 11. 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。
- 12. ELISPOT 板斑点计数，**并记录斑点的各种参数，做统计分析。

结果判断相关指导

结果判断：

当测试孔 A 和（或）测试孔 B 达到下列标准则判定为阳性结果：

- （1） 如果阴性对照孔斑点数为 0-5spots，用测试 A 和（或）测试孔 B 的斑点数减去阴性对照孔斑点数 ≥ 6 ；
- （2） 如果阴性对照孔斑点数 ≥ 6 spots，测试孔 A 和（或）测试孔 B 的斑点数必须 ≥ 2 倍阴性对照孔斑点数。

结果解释：

1. 阳性结果提示测试样本中含有针对结核杆菌特异的效应 T 淋巴细胞。
2. 阴性结果提示测试样本中不含有针对结核杆菌特异的效应 T 淋巴细胞。

警告及提示性说明：

1. 所使用的样品来源于人体，所有的样品都应考虑到潜在的感染危险。对所有样品及其成分的处理、使用、储存和放置都应遵守国家的相关规定。
2. 试剂中含有生物防腐剂，可能导致皮肤过敏。使用时应避免接触皮肤，操作时佩戴合适的手套。
3. 显色底物溶液对眼睛、呼吸系统和皮肤有刺激。呼吸吸入、皮肤接触或口腔摄入有害。使用时应避免吸入蒸汽和喷射物，避免皮肤和眼睛接触，应使用合适的防护服、眼镜和采取皮肤保护设施。
4. 试剂盒的测定结果仅作为疾病的临床辅助诊断依据。

操作相关指导

关于洗涤：

用排枪每孔加入 200-300 μ 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。**

注意事项：

1. **Washing buffer (50x)** 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(1x) / Dilution buffer R(10x)** 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。
3. 实验前请务必将板条编号，预防实验过程中因板条掉落而造成的混淆，推荐两端编号，防止板条断裂；扣干过程同样需采取相应措施，防止板条松动掉落；
4. 取下板条时，请开启后盖，从后均匀按压板条两端，使其掉落。从正面取用板条易致其不规则断裂；

试剂盒的保存

4°C 保存可稳定 12 个月。

开启后建议一次性用完。

必要时分装保存。

注意事项：

1. 预包被板条请在超净台中开启包装，取用后剩余板条请放回真空铝箔袋中，置入透明自封袋密封保存，推荐使用无菌封口膜将板条逐根封口，也可视每次取用量分装保存；
2. 板架为重复利用，再次使用前可选择酒精或者紫外消毒等方式。

常见问题及解决方案：

1. 如果阴性对照孔斑点数超过 10 应小心判断结果。具体请参照有关人为斑点判断的疑难指导，建议仔细观察图像以区分人为假象。

2. 阳性对照孔斑点数应超过 20 个或遍布整个反应孔。阳性对照内含有的植物血凝素（PHA）可以判断每个测试样本所加入细胞的活力以及试剂是否工作。极少患者的 T 淋巴细胞对 PHA 刺激反应极为微弱，当阳性对照孔、测试孔 A、测试孔 B 都没有反应时，应重复实验以确认结果。当阳性对照孔无反应，而测试孔 A 与测试孔 B 内有 1 个或 2 个都有反应时，应判断结果为阳性。如果不能达到上述标准，则实验结果无效。

3. 微孔板放置于保护性基座内，在加入显色底物溶液底物反应完成后才可移去。

4. 实验用试剂提前半小时在室温进行热平衡。

5. 移液器吸头或自动洗板器请不要接触到微孔板内 PVDF 膜。吸头或洗板机造成的压痕或缺口产生假象可能导致结果误判。

6. 本试剂盒建议一次性用完。

7. 每份测定样本必须同时设置阴性和阳性对照。

8. 不同批试剂不得混用。

9. 不同的移液器和洗涤技术、培养时间和/或温度将会影响实际的操作结果。

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 γ 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- γ precoated ELISPOT kit	48 T
DKW22-1000-096		96 T
DKW22-1000-500		5 \times 96T
DKW22-1000-096(strips)	Human IFN- γ 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 IL-4 precoated ELISPOT kit	48 T
DKW22-1040-096		96 T
DKW22-1040-500		5 \times 96T
DKW22-2000-048	Mouse IFN- γ precoated ELISPOT kit	48 T
DKW22-2000-096		96 T
DKW22-2000-500		5 \times 96T
DKW22-2040-048	Mouse IL-4 precoated ELISPOT kit	48 T
DKW22-2040-096		96 T
DKW22-2040-500		5 \times 96T
DKWHBV-1001-048	HBV C IFN- γ ELISPOT kit	48T
DKWHBV-1001-096		96T
DKWTB-1002-048	TB IFN- γ ELISPOT kit	48T
DKWTB-1002-096		96T
DKWHBV-1001-096(strips)	HBV C IFN- γ ELISPOT kit (板条可拆卸)	96T
DKWTB-1002-096(strips)	TB IFN- γ 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	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								

