

*PRODUCT INFORMATION AND MANUAL*

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

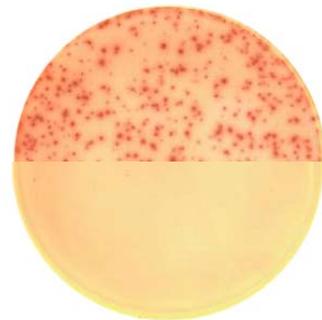
Cat# : DKW22-1000-500

**For research use only.**

**Not for diagnostic or therapeutic procedures**

**(1301)**

**Human IFN- $\gamma$   
DKW22-1000-500**



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

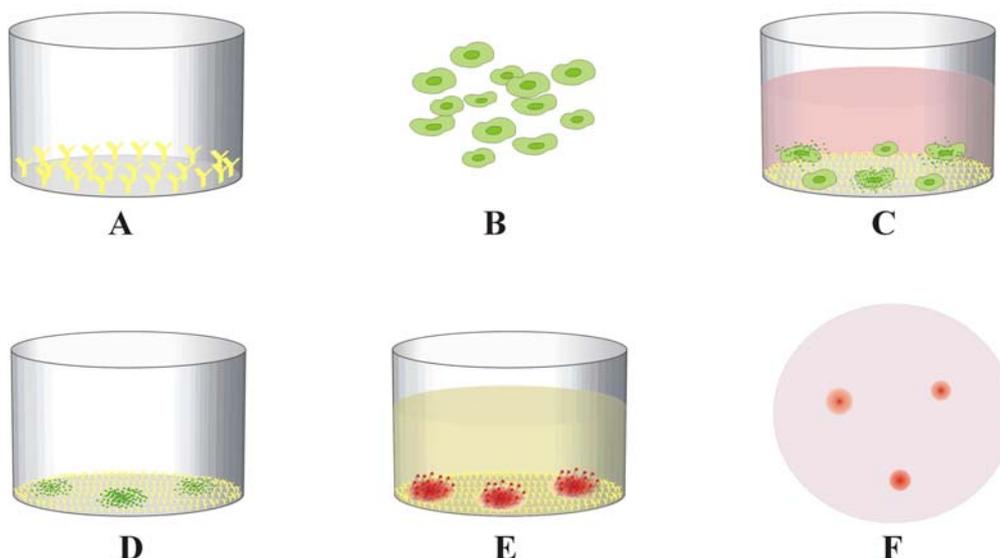
## 产品简介：

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  $\gamma$ -干扰素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  $\gamma$ -干扰素），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  $\gamma$ -干扰素）。

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 (5 × 96T)
Biotinylated antibody	冻干粉
Streptavidin-HRP	500 $\mu$ L
Dilution buffer R (10 $\times$ )	10mL
Washing buffer (50 $\times$ )	25mL $\times$ 2
AEC dilution	25mL $\times$ 2
AEC solution I (20 $\times$ )	5mL
AEC solution II (20 $\times$ )	3mL
AEC solution III (200 $\times$ )	500 $\mu$ L
预包被 PVDF 板	5 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. **Dilution buffer R(10×)**: 用 1×PBS 稀释(1:10), 制成 **Dilution buffer R(1×)**备用。
2. **Washing buffer (50×)**: 用去离子水稀释(1:50), 制成 **1× Washing buffer** 备用。
3. 生物素标记的抗体 (Biotinylated antibody, Secondary antibody) : 按标签溶解后, 用 **Dilution buffer R(1×)**稀释(1:100), 即为工作液。
4. 酶联亲和素 (Streptavidin-HRP) : **Dilution buffer R (1×)** 稀释 (1:100), 即为工作液。
5. **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

6. **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

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：加工作浓度的阳性刺激物。  
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。
- 3 生物素标记抗体、酶联亲和素等试剂**请做好每次用量计划，防止不足。

## 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。

## 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]中国药理学杂志,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 IL-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 IL-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	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								

