Mouse IFN-γ precoated ELISPOT kit（strips）

Cat# : 2210005

产品描述：

深圳市达科为生物工程有限公司生产的达优®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 ºC 可存放 12 个月。

达优®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几率。使得实验者能够轻松、高效地完成复杂的 ELISPOT 检测实验。

试剂盒提供的试剂、规格：

名　　称	规格×数量
Biotinylated Antibody	100 μL×1 支
Streptavidin-HRP	100 μL×1 支
Dilution Buffer R (1×)	10 mL×2 瓶
Washing Buffer (50×)	15 mL×1 瓶
AEC Dilution	10 mL×1 瓶
AEC Solution I (20×)	500 μL×1 支
AEC Solution II (20×)	500 μL×1 支
AEC Solution III (200×)	50 μL×1 支
阳性刺激物	50T
预包被 PVDF 可拆板	1 块

实验者自备的试剂与仪器：

1. RPMI-1640 基础培养基（需要添加双抗）
2. 无血清培养基（完全培养基，即用型），推荐使用达优@ELISPOT 无血清培养基。
3. 超净工作台
4. CO_2 细胞培养箱
5. 微量移液器及配套 Tip 头
6. 8 通道微量移液器
7. 0.5 mL，1.5 mL EP 管
8. 酶联斑点分析仪

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）

- **试剂配制**

1. **阳性刺激物：**现配现用。
2. **无血清培养基：**如果没有 ELISPOT 无血清培养基，可用含 5-10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基代替。

- **操作步骤**

1. **预包被板的活化：**200 μL/well 加入 RPMI-1640 培养基或者无血清培养基，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 μL/well。

   正对照孔：细胞浓度可采用 1×10^5 cells/well；

   负对照孔：细胞浓度由实验者根据实验自行调整，跟实验孔保持一致；

   背景负对照：加入不含细胞的无血清培养基（或重悬细胞所用的培养基）；

   实验孔：细胞浓度由实验者根据实验自行调整。

3. **加入刺激物**：10 μL/well，具体如下：

   正对照孔：加入工作浓度的阳性刺激物；

   负对照孔：不加阳性刺激物；

   背景负对照孔：不加阳性刺激物；

   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×终浓度）。

4. **孵育**：所有样品和刺激物加完后，盖好板盖。放入 37°C，5％CO_2 培养箱静置培养 16-24 小时。

第二天：培养后操作（不再需要无菌操作）

- **试剂配制**

1. **注意：1×工作液**及**显色液**现配现用。
2. **Washing Buffer（50×）**：用去离子水稀释（1：50），制成 **1×Washing Buffer 工作液**备用。
3. **生物素标记的抗体（Biotinylated Antibody）**：用 Dilution Buffer R (1×) 稀释（1：100），制成 **1×Biotinylated Antibody 工作液。**
4. **酶联亲和素（Streptavidin-HRP）**：用 Dilution Buffer R (1×) 稀释（1：100），制成 **1×Streptavidin-HRP 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×)
1 mL	0.9 mL	50 μL	50 μL	5 μL
2 mL	1.8 mL	100 μL	100 μL	10 μL
3 mL	2.7 mL	150 μL	150 μL	15 μL
4 mL	3.6 mL	200 μL	200 μL	20 μL
5 mL	4.5 mL	250 μL	250 μL	25 μL
8 mL	7.2 mL	400 μL	400 μL	40 μL
10 mL	9 mL	500 μL	500 μL	50 μL

- **操作步骤**

1. **裂解细胞**：倾倒孔内细胞及培养基。加入冰冷的**去离子水**，200 μL/well，4°C冰箱放置 10 分钟低渗裂解细胞。
2. **洗板**：甩出孔内液体，加入 **1×Washing Buffer 工作液**，260 μL/well，停留 1 分钟后弃去孔内液体，重复六次，每一次在吸水纸上扣干。
3. **检测抗体孵育**：将 **1×Biotinylated Antibody 工作液**加入各实验孔，100 μL/well。37°C 孵育 1 小时。
4. **洗板**：重复步骤 2。
5. **酶联亲和素孵育**：将 **1×Streptavidin-HRP 工作液**加入各实验孔，100 μL/well 37°C 孵育 1 小时。
6. **洗板**：甩出孔内液体，加入 **1×Washing Buffer 工作液**，260 μL/well，停留 1 分钟后弃去孔内液体，重复五次，每一次在吸水纸上扣干，洗涤完成后揭开板底座，用去离子水/自来水洗涤膜底面及底座，用吸水纸小心吸干底座及膜底残留的水迹，合上底座，加入 **1×Washing Buffer 工作液**，260 μL/well，停留 1 分钟后弃去孔内液体，彻底扣干孔内液体。
7. **显色**：将现配的 AEC 显色液加入各实验孔，100 μL/well。室温避光静置 5-30 分钟，根据斑点生成情况选择

终止显色时间。若室温低于 20℃，建议在 37℃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**洗涤各实验孔正反面及底座 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。

洗涤指导：

用排枪每孔加入 260 μL 洗涤缓冲液。加入洗涤缓冲液之后浸泡 1 分钟，然后扣出洗涤缓冲液。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。

注意：1、**Washing Buffer(50×)** 4℃存放后出现结晶析出为正常现象，用前半小时置于 37℃轻摇混匀可消除结晶，对实验结果无影响。

2、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。

3、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。

试剂盒的存放：

4ºC 保存可稳定 12 个月。开启后一次性用完。必要时分装保存

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.

相关产品：

1. 预包被 ELISPOT 试剂盒

货　号	名　称	规　格
2110002	Human IFN-γ Precoated ELISPOT Kit	96 T
2110003		5×96 T
2110005	Human IFN-γ Precoated ELISPOT Kit (strips)	96 T
2110006		5×96 T
2110202	Human IL-2 Precoated ELISPOT Kit	96 T
2110203		5×96 T
2111002	Human IL-10 Precoated ELISPOT Kit	96 T
2111003		5×96 T
2111702	Human IL-17A Precoated ELISPOT Kit	96 T
2111703		5×96 T
2117202	Human TNF-α Precoated ELISPOT Kit	96 T
2117203		5×96 T
2110022	TB IFN-γ ELISPOT Kit	96 T
2110025	TB IFN-γ ELISPOT Kit (strips)	96 T
2210002	Mouse IFN-γ Precoated ELISPOT Kit	96 T
2210003		5×96 T
2210005	Mouse IFN-γ Precoated ELISPOT Kit (strips)	96 T
2210006		5×96 T
2210402	Mouse IL-4 Precoated ELISPOT Kit	96 T
2210403		5×96 T

2. 细胞分离液产品

货　号	名　称	规　格
7211011	Mouse 1× Lymphocyte Separation Medium 小鼠淋巴细胞分离液	100 mL/瓶
7001011	General Cell Separation Medium 通用型细胞分离液	A:50 mL/瓶 B:125 mL/瓶

3. 达优®冻存试剂盒

货　号	名　称	规　格
6031011	达优®Freezing Kit（达优®冻存试剂盒）	50 mL/kit
6032011	Serum-Free Cell Freezing Medium 无血清细胞冻存液	100 mL/支

4.ELISPOT 无血清培养基

货　号	名　称	规　格
6211011	Serum-Free Medium for Mouse Lymphocyte SuperCulture®小鼠淋巴细胞培养基	250 mL/瓶
6015012	Serum-Free Medium for ELISPOT, universal 广谱型 ELISPOT 专用无血清培养基	100 mL/瓶

深圳市达科为生物工程有限公司
地址：深圳市坪山区坑梓街道金辉路 14 号生物医药创新产业园 1 号楼 702、703
邮编：518118　Tel: 0755-86235300　Web: www.dakewe.com　E-mail: rd@dakewe.com