Mouse IFN-γ precoated ELISPOT kit（strips）说明书

Cat# : DKW22-2000-500s

产品描述：

达科为公司生产的达优®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®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。

试剂盒提供的试剂、规格：

名　　称	规格（5 ×96T）
Biotinylated antibody	100μL× 5
Streptavidin-HRP	500μL
Dilution buffer R（10×）	10mL
Washing buffer (50×)	25mL×2
AEC dilution	25mL×2
AEC solution Ⅰ（20×）	5mL
AEC solution Ⅱ（20×）	3mL
AEC solution Ⅲ（200×）	500μL
预包被 PVDF 可拆板	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，不需要添加血清）
2. 无血清培养基（完全培养基，即用型）
3. 超净工作台
4. CO_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. 0.5mL, 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. **Dilution buffer R(10×)：** 用 1×PBS 稀释(1:10)，制成 **Dilution buffer R(1×)**备用。
3. **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。
4. **酶联亲和素(**Streptavidin-HRP)：用 **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**：200μL/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，100μL/well。

   正对照孔：细胞浓度可采用 1×10^5 cells/well；

   负对照孔：细胞浓度可采用 1×10^5 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**：10μL/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×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**，200μL/well，4℃冰箱放置 10 分钟低渗裂解细胞。
2. **洗板**：倾倒孔内液体，**1×Washing buffer**，200μL/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，100μL/well。37°C 孵育 1 小时。
4. **洗板**：倾倒孔内液体，**1×Washing buffer**，200μL/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，100μL/well。37°C 孵育 1 小时。
6. **洗板**：倾倒孔内液体，**1×Washing buffer**，200μL/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，100μL/well。室温避光静置 15-45 分钟（在 20 -25°C，显色 25 分钟较合适）。若室温低于 20°C，建议在 37°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 200-300μL 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×) 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. Dilution buffer R(1×) / Dilution buffer R(10×) 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
DKW22-1000-048	Human IFN-γ precoated ELISPOT kit	48 T
DKW22-1000-096		96 T
DKW22-1000-500		5×96T
DKW22-1000-096（strips）	Human IFN-γ precoated ELISPOT kit（板条可拆卸）	96 T
DKW22-1000-500（strips）		5×96T
DKW22-1040-048	Human IL-4 precoated ELISPOT kit	48 T
DKW22-1040-096		96 T
DKW22-1040-500		5×96T
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

2. 淋巴细胞分离液

货 号	名 称	规 格
DKW-LST-015	Human Lymphocyte Separation Tube 人淋巴细胞分离管	24 支/盒
DKW-LST-050		10 支/盒
DKW-LSH-0100	Human Lymphocyte Separation Medium 人淋巴细胞分离液	100mL
DKW-LSH-0400		4×100mL
DKW33-R0100	Mouse 1× Lymphocyte Separation Medium 小鼠淋巴细胞分离液	100mL
DKW33-R0400		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（广谱型）	100mL
DKW34-EU0400		4×100mL
DKW34-EH0100	Serum-Free Medium for ELISPOT, human（人类）	100mL
DKW34-EH0400		4×100mL

达科为生物工程有限公司

Dakewe Biotengineering Co., LTD (1301)