

人干扰素- γ (IFN- γ) 抗体对试剂盒

(酶联免疫分析法)

【产品名称】

人干扰素- γ (IFN- γ) 抗体对试剂盒

【规格】

5 plates

【货号】

CRS-D001

【背景介绍】

γ 干扰素 (interferon gamma, IFN- γ) 是CRS最重要的生物标志物之一，主要由CD8+ T细胞、Th1 CD4+ T和自然杀伤细胞 (NK) 在多种刺激下分泌，通过包括抑制Th2细胞分化、刺激Th1细胞增殖、促进巨噬细胞活化、诱导MHC I/MHC II表达等实现抗病毒、免疫调节、调控细胞增殖分化等多样广泛的生物学作用。

为支持CAR-T药物的开发, ACROBiosystems 自主研发出人 γ 干扰素 (IFN- γ) 抗体对试剂盒, 可用于检测评价T细胞激活试剂的刺激作用, 在药物开发及CMC质控阶段对CAR-T产品疗效与功能进行评价。

【检测原理】

本试剂盒应用ELISA夹心法。先将Human IFN- γ Capture Antibody包被在微孔板上, 样本中的Human IFN- γ 与微孔板上固定的Human IFN- γ Capture Antibody结合, 然后加入Human IFN- γ Detection Antibody, 形成抗体-抗原-生物素标记抗体复合物, 最后加入Streptavidin-HRP, 用底物显色, 随后用终止液终止, 板孔中溶液由蓝色变为黄色, 使用酶标仪在450 nm和630 nm处测定样品吸光度值 (OD450 nm、OD630 nm), OD值与样本中人干扰素- γ (IFN- γ) 含量呈正相关。

【注意事项】

1. 仅供科研使用，不可用于体外诊断；
2. 该试剂盒适用于细胞上清、血清和血浆样本；
3. 请在试剂盒有效期内使用；
4. 不同试剂盒及不同批号试剂盒的组分不能混用；
5. 样本值若大于标准曲线的最高值，应将样本用 1×Dilution Buffer 稀释后重新检测；若细胞上清样本需分步稀释，除最后一步用稀释剂稀释外，其它中间稀释可采用细胞培养基；
6. 检测结果的不同可由多种因素引起，包括实验人员的操作、移液器的使用方式、洗板技术、反应时间或温度、试剂盒的储存等；
7. 本试剂盒在设计上去除或降低了生物学样本中的一些内源性干扰因素，并非所有可能的影响因素都已经去除。

【产品组份】

表1.产品组份

ID	组份名称	规格 (5 plates)	物理状态	存储条件	
				未开启	已开启
CRD001-C01	Human IFN- γ Capture Antibody	30 μ g	冻干粉	2-8°C	-70°C
CRD001-C02	Human IFN- γ Standard	30 μ g	冻干粉	2-8°C	-70°C
CRD001-C03	Human IFN- γ Detection Antibody	60 μ g	冻干粉	2-8°C	-70°C
CRD001-C04	Streptavidin-HRP	100 μ L	液体	2-8°C, 避光	2-8°C, 避光

【储存条件及有效期】

未开封：试剂盒保存于2-8°C，试剂盒自生产之日起有效期为12个月，有效期见外包装标签。

已开封：试剂盒开封后各组分按照表1存储条件保存，有效期自开封之日起为30天，未使用完的微孔板条需与干燥剂一起密封保存。

注：1. 不要使用过期试剂。

2. 冻干粉重构后需-70°C储存，建议冻融次数不要超过1次，分装规格不低于10 μ g。

【需要但未提供的实验耗材及解决方案】

1. 96孔酶标板(96 well microplates): Corning 康宁、货号# 42592
2. 包被缓冲液(1xPBS): Solarbio 索莱宝、货号# P1020 (1.5 mM KH₂PO₄、8.1 mM Na₂HPO₄、137 mM NaCl、2.7 mM KCl, pH 7.2-7.4, 0.2 μm filtered)
3. 洗涤缓冲液(1xWashing Buffer): Solarbio 索莱宝、货号# P1033 (0.05% Tween-20 in PBS, pH 7.2-7.4)
4. 封闭缓冲液(Blocking Buffer): 2% BSA(盐城赛宝、货号# N/A) in 1xWashing Buffer
5. 稀释缓冲液(Dilution Buffer): 0.5% BSA(盐城赛宝、货号# N/A) in 1xWashing Buffer
6. 显色液(Substrate Solution): InnoReagents 湖州英创、货号# TMB-S-004
7. 终止液(Stop Solution): 2 N H₂SO₄

【试剂准备】

使用前将所有试剂恢复至室温（20°C-25°C）。如果溶液中有晶体形成，需平衡溶液至晶体完全溶解（可将溶液放置于恒温培养箱37°C平衡10-15 min）。

按照表2建议，用超纯水将所提供的冻干品配制成存储溶液，在室温下溶解15至30分钟，轻轻吹吸混匀，避免剧烈摇动或涡旋。重构的存储液应在-70°C保存，建议冻融次数不要超过1次，分装规格不低于10 μg。

表2. 配制方法

ID	组份名称	规格 (5 plates)	存储液浓度	重构水体积
CRD001-C01	Human IFN-γ Capture Antibody	30 μg	200 μg/mL	150 μL
CRD001-C02	Human IFN-γ Standard	30 μg	150 μg/mL	200 μL
CRD001-C03	Human IFN-γ Detection Antibody	60 μg	200 μg/mL	300 μL

【检测流程】

1. 包被:

用包被缓冲液(1xPBS)将重构后的 Human IFN- γ Capture Antibody (CRD001-C01) 稀释至 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 需现用现配, 每孔加入 100 μL , 贴上封板膜, 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 16h 或过夜。

2. 洗涤:

小心揭开封板膜, 弃去孔中液体, 每孔加入 300 μL 洗涤缓冲液(1xWashing Buffer), 浸泡 5-10 s, 共洗板 3 次。每次洗板需在吸水纸上轻轻拍干, 也可选择机洗。

3. 封闭:

每孔加入 300 μL 的封闭缓冲液(Blocking Buffer), 室温孵育 2.0h。

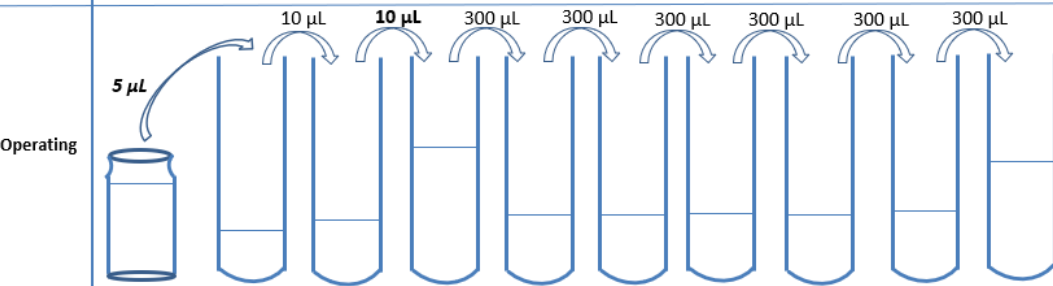
4. 洗涤:

重复步骤 2。

5. 加标准品及待测样本:

5.1 制备标准曲线:

复溶后标准品 (CRD001-C02) 的浓度为 150 $\mu\text{g/mL}$, 取 5 μL 的标准品储存液, 加入到 245 μL 的稀释液中 (Std.-0), 然后取 Std.-0 溶液 10 μL , 加入到 290 μL 的稀释液中 (Std.-1'), 最后取 Std.-1' 溶液 10 μL , 加入到 790 μL 的稀释液中, 作为标准曲线的最高浓度 Std.-1 (1250 pg/mL)。在后续每一个离心管中加入 300 μL 稀释液, 使用高浓度标准品做 1:1 系列稀释。每次移液时, 确保充分混匀。以稀释液作为标准曲线的零浓度。

Tubes/ Solution Code	Human IFN- γ Standard stock solution	Std.-0	Std.-1'	Std.-1	Std.-2	Std.-3	Std.-4	Std.-5	Std.-6	Std.-7
Operating		10 μL	10 μL	300 μL	300 μL	300 μL	300 μL	300 μL	300 μL	300 μL
Solution Con.	150 $\mu\text{g/mL}$	3000 ng/mL	100 ng/mL	1250 pg/mL	625 pg/mL	312.5 pg/mL	156.3 pg/mL	78.1 pg/mL	39.1 pg/mL	19.5 pg/mL
Dilution Buffer Vol.		245 μL	290 μL	790 μL	300 μL	300 μL	300 μL	300 μL	300 μL	300 μL

5.2 样本处理:

a.若待测样本为血清/血浆, 建议用 Dilution Buffer 进行 5 倍稀释, 样本与稀释液的体积比为 1:4。

b.若待测样本为细胞上清, 建议用 Dilution Buffer 进行 2 倍稀释, 样本与稀释液的体积比为 1:1。

5.3 加样:

将待测样本和系列稀释后的标准品 (Std.-1 ~ Std.-7) 加入反应孔内, 每孔加入 100 μ L, 空白对照孔加入 100 μ L Dilution Buffer。待测样品和标准曲线建议设置复孔。

6. 孵育:

用封板膜封板, 室温孵育 1.0 h。

7. 洗板:

重复步骤 2。

8. 加 Human IFN- γ Detection Antibody:

用 Dilution Buffer 将重构后的 Biotinylated-Human IFN- γ Detection Antibody 稀释至 1.0 μ g/mL, 在对应板孔内加入 100 μ L, 需现用现配。

9. 孵育:

用封板膜封板, 室温孵育 1.0 h。

10. 洗板:

重复步骤 2。

11. 加 Streptavidin-HRP:

用 Dilution Buffer 将 Streptavidin-HRP 稀释 2000 倍, 在对应板孔内加入 100 μ L, 该工作液现用现配, 避光保存。

12. 孵育:

用封板膜封板, 室温孵育 30 min。

13. 洗板:

重复步骤 2。

14. 显色:

每孔加入 100 μ L Substrate Solution。用封板膜封板，需避光，室温孵育 20 min。

15. 终止:

每孔加入 50 μ L Stop Solution，轻轻震荡酶标板至混合均匀。

注: 孔中液体由蓝色完全变为黄色。

16. 读数:

用酶标仪测定各孔在 450 nm 和 630 nm 波长的吸光值，请在终止后 10 分钟内读数。

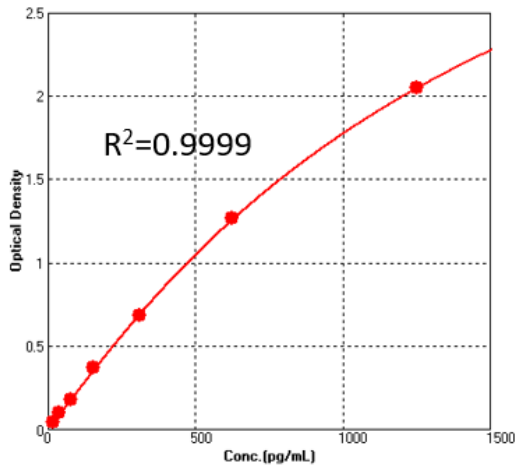
注: 各孔 OD450 nm扣除OD630 nm读值可降低背景干扰。

【结果分析】

- a. 将标准品和样本的复孔读数求取平均值，然后减去零浓度标准品的 OD 值。
- b. 以标准品的浓度作为横坐标，OD 值作为纵坐标，利用四参数拟合绘制标准曲线，进行样本浓度的计算，计算浓度时需乘以相应的稀释倍数。若利用直线回归拟合，需选取合适的绘制区间，从而得到最佳的拟合曲线，保证回归分析的准确性。
- c. 标准曲线 R^2 应大于 0.9900。
- d. 标准曲线范围: 19.5 pg/mL-1250 pg/mL。大于分析标准曲线范围的样品应报告为大于 1250 pg/mL 或稀释样品使其在线性范围内。小于分析标准曲线的样品应报告为小于 19.5 pg/mL。

【典型数据】

每次实验，每块酶标板都需要设置标准曲线，以下标准曲线数据仅供参考。



Conc.(pg/mL)	O.D. -1	O.D. -2	Average	Corrected
1250	2.054	2.133	2.094	2.050
625	1.383	1.243	1.313	1.270
312.5	0.725	0.738	0.732	0.688
156.25	0.449	0.384	0.417	0.373
78.125	0.239	0.214	0.227	0.183
39.0625	0.146	0.142	0.144	0.101
19.53125	0.093	0.089	0.091	0.048
0	0.044	0.043	0.044	/

【特异性】

本试剂盒可识别天然和重组的人 IFN- γ 。下面列出的因子进行特异性测定，未观察到明显的交叉反应。

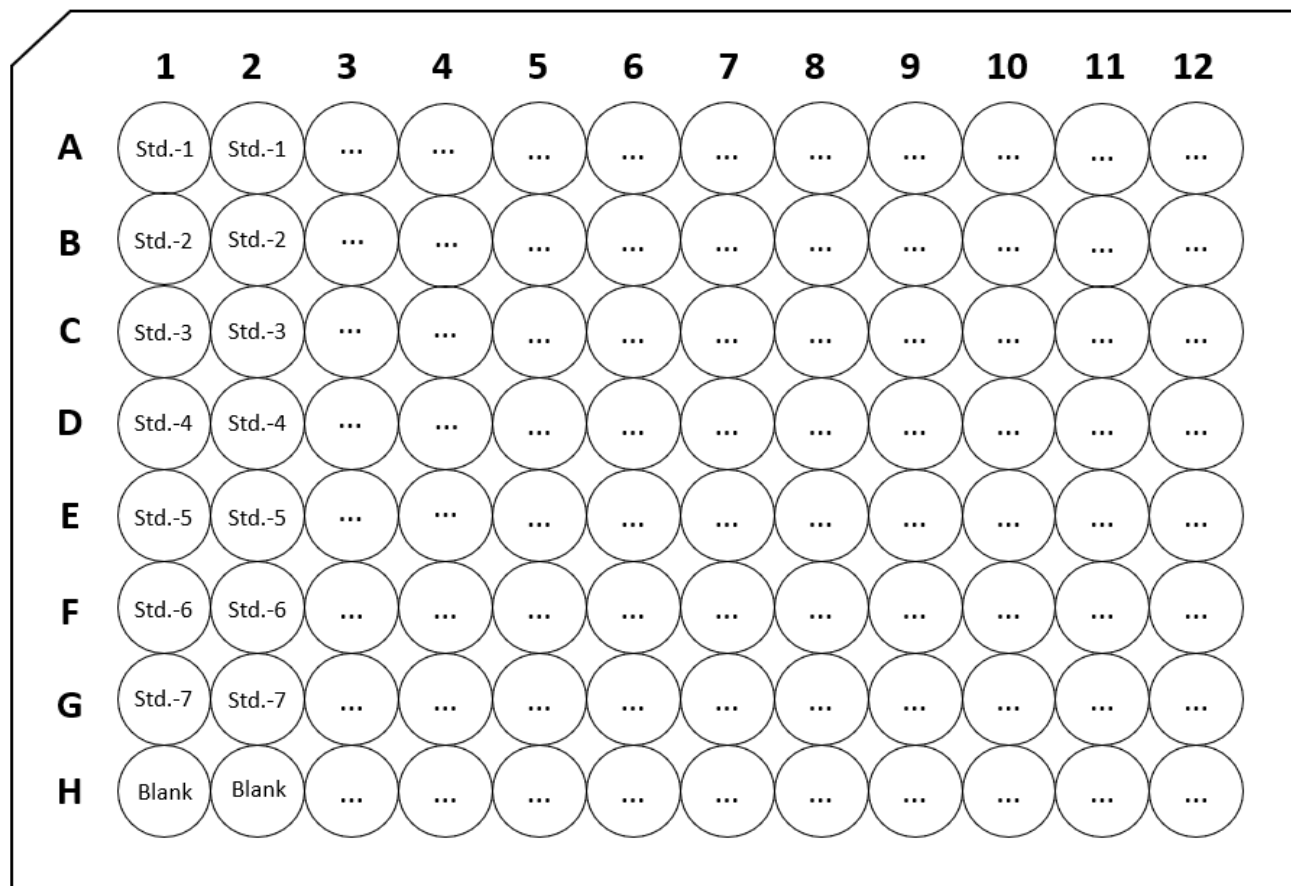
人	
IL-2	IL-7
IL-4	TNF- α
IL-6	IL-1 β
IL-10	IL-15
GM-CSF	IL-21

【校准】

本试剂盒的标准品经大肠杆菌表达的高纯度重组人 IFN- γ (87/586) 校准，后者由英国国家生物标准与检定所/世界卫生组织于 2013 年 4 月进行校准。

【PLATE LAYOUT】

建议使用此平板布局记录标准品和样品



注：Blank为空白对照Dilution Buffer孔。

【实验过程中可能遇到的问题及解决方案】

问题	可能的原因	解决办法
1. 结果 OD 值非常低	<p>(1) 孵育的时间或温度不够;</p> <p>(2) 显色反应时间太短;</p> <p>(3) 所用配制缓冲液的蒸馏水有问题;</p> <p>(4) 不正确的试剂储存方式或/和加入抗体/酶的工作液浓度太低;</p> <p>(5) 酶标仪滤光片不正确;</p> <p>(6) 不正确的试剂储存方式;</p> <p>(7) 试剂盒没有充分平衡;</p> <p>(8) 移液器吸液量不足, 吸嘴内壁挂水太多或内壁不清洁;</p> <p>(9) 包袋中有湿气;</p> <p>(10) 试剂在使用前未混匀;</p> <p>(11) 洗涤步骤过于剧烈;</p> <p>(12) 实验开始后, 微孔变干燥;</p>	<p>a. 校正孵育箱温度;</p> <p>b. 校正定时钟准确定时;</p> <p>c. 使用新鲜合格的蒸馏水;</p> <p>d. 按照说明书保存试剂盒和准确配制工作液;</p> <p>e. 校正酶标仪;</p> <p>f. 保证各试剂在推荐储存温度下储存;</p> <p>g. 试剂室温平衡至少 15 分钟, 确保所有试剂已平衡至室温 (20-25°C);</p> <p>h. 校正移液器, 吸嘴要配套, 装吸嘴时要紧密, 吸嘴内壁要清洁, 最好一次性使用;</p> <p>i. 首次开袋标上日期, 封好未使用的孔条, 放入干燥剂;</p> <p>j. 使用前混匀试剂;</p> <p>k. 降低洗涤系统的压力;</p> <p>l. 实验过程勿中断, 应连续完成所有的实验步骤;</p>
2. 标准曲线和测定的重复性差	<p>这是典型的由测定操作引起的问题, 包括但不限于:</p> <p>(1) 加样本及试剂量不准; 孔间不一致; 加错样本; 温育时间、洗板、显</p>	<p>a. 重复测定样本, 操作条件、人员等应尽可能与上次保持一致, 以排除这些因素造成的不一致的可能性;</p> <p>b. 尽可能使用同一移液器并装紧吸</p>

	<p>色时间不一致；</p> <p>(2) 加样本及试剂时，加在孔壁上部非包被区；</p> <p>(3) 加样过快，孔间发生污染；</p> <p>(4) 试剂/样本没有混匀；</p> <p>(5) 样本中有杂质或沉淀物；血清样本未完全凝固即加入，反应孔内出现纤维蛋白凝固或残留血细胞，易出现假阳性反应等；</p> <p>(6) 微孔中有气泡；</p> <p>(7) 倍比稀释标准品时未混匀；</p> <p>(8) 过早稀释</p> <p>(9) 使用用过的封板胶纸</p> <p>(10) 加入的体积不正确</p> <p>(11) 不同批号试剂盒中组分混用；</p>	<p>嘴；</p> <p>c. 加液时小心操作；</p> <p>d. 样本稀释前应充分混匀，确保充分混匀试剂；</p> <p>e. 使用前离心；</p> <p>f. 用针尖挑破气泡；</p> <p>g. 稀释标准品的每一步均需混匀；</p> <p>h. 标准品在快要使用时稀释；</p> <p>i. 每次须使用新的封板胶封住反应；</p> <p>j. 快速、等量的将标准品分配到各个微孔中；</p> <p>k. 不混用不同批号试剂盒中组分；</p>
<p>3. 空白背景高</p>	<p>(1) 洗板不干净；</p> <p>(2) 试剂过期；</p> <p>(3) 洗涤不充分；</p> <p>(4) 阴性对照孔被阳性对照或样品污染；</p> <p>(5) 蒸馏水受酶等污染；</p> <p>(6) 试剂混用；</p> <p>(7) 试剂配制浓度有误，如酶的浓度过高；</p> <p>(8) 孵育温度过高或反应时间过长；</p>	<p>a. 浓缩洗液准确配制：10xWashing Buffer 如有结晶则应让结晶于室温全部溶解后再量取稀释；</p> <p>b. 使用保质期内试剂；</p> <p>c. 充分洗涤，彻底拍干；</p> <p>d. 加样或加酶拍板的滤纸应弃去不用，不要反复使用，否则易造成污染；吸嘴尽可能一次性使用；</p> <p>e. 使用新鲜蒸馏水；</p> <p>f. 不同批号试剂勿混用；</p>

	<p>(9) 显色时间过长;</p> <p>(10) 底物在使用前曝光;</p> <p>(11) 读板前停留时间过长;</p>	<p>g. 请按说明书所示稀释倍数配制;</p> <p>h. 检查孵育箱的温度是否正确、稳定;</p> <p>i. 显色反应时间适当缩短;</p> <p>j. 应保存在暗处, 避光;</p> <p>k. 加终止液后 10 分钟内读数;</p>
4.边缘效应	<p>(1) 蒸发;</p> <p>(2) 温度不均匀;</p>	<p>a. 各步之间, 须使用封版胶密封反应板;</p> <p>b. 校准孵育箱, 勿叠放反应板;</p>
5.标准曲线良好, 但样本无检测信号	<p>(1) 样本中无检测物或检测物含量极低;</p> <p>(2) 样本中其他物质影响/掩盖检测;</p> <p>(3) 样本中检测物浓度过高, Hook 效应导致假低值。</p>	<p>a. 设置内参, 重新实验;</p> <p>b. 作适当稀释, 降低其他物质的干扰, 或作系列稀释, 检测回收率;</p> <p>c. 适当倍数稀释样本, 检测物浓度尽量在试剂盒检测范围内。</p>