

人干扰素 γ ELISPOT试剂盒

【产品名称】

人干扰素 γ ELISPOT试剂盒

【规格】

96 Tests

【货号】

RAS-SP001

【预期用途】

本试剂盒用于定量检测单细胞产生和分泌的人干扰素 γ 。

【检测原理】

本试剂盒基于双抗夹心法。PVDF膜微孔板预包被了Anti-IFN- γ Antibody，细胞分泌的IFN- γ 与微孔板上固定的Anti-IFN- γ Antibody结合，然后加入Biotin-Anti-IFN- γ 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，终止后板孔底部会形成红褐色斑点。每一个斑点代表一个对特异抗原有反应的特异性T淋巴细胞。斑点可以用ELISPOT分析仪进行自动计数或者用显微镜进行手动计数。

【产品组份】

表1.产品组份

ID	组份名称	规格 (96 T)	物理状态	存储条件	
				未开启	已开启
RSP001-C01	Pre-coated Anti-IFN- γ Antibody Microplate	1 plate	固体	2-8°C	2-8°C
RSP001-C02	Positive Stimulus	10 μ g	冻干粉	2-8°C	-70°C
RSP001-C03	Biotin-Anti-IFN- γ Antibody	50 μ L	液体	2-8°C	2-8°C

RSP001-C04	Streptavidin-HRP	50 μ L	液体	2-8 $^{\circ}$ C	2-8 $^{\circ}$ C
RSP001-C05	Washing Buffer (10 \times)	50 mL	液体	2-8 $^{\circ}$ C	2-8 $^{\circ}$ C
RSP001-C06	Dilution Buffer (1 \times)	50 mL	液体	2-8 $^{\circ}$ C	2-8 $^{\circ}$ C
RSP001-C07	AEC Dilution	25 mL	液体	2-8 $^{\circ}$ C	2-8 $^{\circ}$ C
RSP001-C08	AEC Solution A (20 \times)	0.8 mL	液体	2-8 $^{\circ}$ C, 避光	2-8 $^{\circ}$ C, 避光
RSP001-C09	AEC Solution B (20 \times)	0.8 mL	液体	2-8 $^{\circ}$ C	2-8 $^{\circ}$ C
RSP001-C10	AEC Solution C (20 \times)	0.8 mL	液体	2-8 $^{\circ}$ C, 避光	2-8 $^{\circ}$ C, 避光

【储存条件及有效期】

1. 未开封：试剂盒保存于2-8 $^{\circ}$ C，有效期见外包装标签。
2. 已开封：试剂盒开封后尽量一次使用完，使用开封后的试剂盒获得的结果无法保证准确。

注：不要使用过期试剂。

【需要但未提供的实验仪器与耗材】

1. 超净工作台
2. CO₂细胞培养箱
3. 斑点分析仪或显微镜
4. 单道、多道移液器及配套Tip头
5. 无菌RPMI-1640基础培养基

【试剂准备】

使用前将试剂盒恢复至室温 (20 $^{\circ}$ C-25 $^{\circ}$ C)。如溶液中有晶体形成，需平衡溶液至晶体完全溶解。

【检测流程】

1. 试剂配制

1.1 阳性刺激物：

按照表2建议，用无菌水将所提供的冻干品进行重构，溶解15至30分钟后轻轻吹吸混匀。

此步骤需在无菌环境下操作。

表2. 配制方法

ID	组份名称	规格 (96 T)	重构体积 Vol.	存储液浓度.
RSP001-C02	Positive Stimulus	10 µg	100 µL 无菌水	100 µg/mL

1.2 无菌培养基:

可使用10%胎牛血清的RPMI-1640培养基, 建议添加双抗。

1.3 配制1×Washing Buffer:

取50 mL Washing Buffer (10×), 用超纯水/去离子水稀释并定容至500 mL。

1.4 配制Biotin-Anti-IFN-γ Antibody工作液:

用Dilution Buffer (1×)将Biotin-Anti-IFN-γ Antibody稀释400倍, 该工作液现用现配。

1.5 配制Streptavidin-HRP工作液:

用Dilution Buffer (1×)将Streptavidin-HRP稀释2000倍, 该工作液现用现配, 避光保存。

1.6 配制1×AEC显色液: 该工作液需现用现配, 配制比例见表3。

表3. 配制方法

配制体积	AEC Dilution	AEC Solution A (20×)	AEC Solution B (20×)	AEC Solution C (20×)
1 mL	0.85 mL	50 µL	50 µL	50 µL
5 mL	4.25 mL	250 µL	250 µL	250 µL
10 mL	8.5 mL	500 µL	500 µL	500 µL

2. 预包板处理 (无菌操作)

每孔加入 200 µL 无菌的 RPMI-1640 基础培养基, 室温孵育约 10 分钟, 弃掉孔内液体。

3. 加刺激物和细胞悬液 (无菌操作)

每孔先加入 10 µL 的刺激物, 然后加入 100 µL 的细胞悬液, 其中:

- a. 阳性对照孔: 细胞浓度可采用 5×10^4 cells/well, 阳性刺激物的孔内终浓度 0.2 µg/mL (用基

基础培养基将 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的阳性刺激物稀释至 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

- b. 阴性对照孔：细胞浓度可采用 5×10^4 cells/well，不加阳性刺激物。
- c. 背景对照孔：不加细胞，不加阳性刺激物，加入培养基。
- d. 实验孔：实验样本细胞数和实验者的刺激物使用浓度需根据实际情况自行调整。

注：建议实验做 3 复孔。

4. 孵育（无菌操作）

加样完成后，盖好板盖。放入 37°C ，5% CO_2 培养箱中，平放静置培养 18-22 h。

注：盖好的板子建议用铝箔纸平铺包裹，培养时间实验者可根据实际情况进行调整。

5. 洗板

弃掉孔内液体，每孔加入 250 μL 的 1 \times Washing Buffer，浸泡 60 s，弃掉孔内液体，重复 6 次，每次弃液后，需在吸水纸上拍干。

注：此步骤洗板前，可弃掉孔内液体，每孔加入 200 μL 冰冷的去离子水， $2-8^\circ\text{C}$ 放置 5-10 分钟低渗裂解细胞，有助于洗板效果。

6. 加 Biotin-Anti-IFN- γ Antibody

在对应板孔内加入 100 μL 稀释的 Biotin-Anti-IFN- γ Antibody（1:400 稀释），该工作液现用现配。 37°C 孵育 1 h。

7. 洗板

弃掉孔内液体，每孔加入 250 μL 的 1 \times Washing Buffer，浸泡 60 s，弃掉孔内液体，重复 6 次，每次弃液后，需在吸水纸上拍干。

8. 加 Streptavidin-HRP

在对应板孔内加入 100 μL 稀释的 Streptavidin-HRP（1:2000 稀释），该工作液现用现配，避光保存。 37°C 孵育 1 h。

9. 洗板

弃掉孔内液体，每孔加入 250 μL 的 1 \times Washing Buffer，浸泡 60 s，弃掉孔内液体，重复 6 次，每次弃液后，需在吸水纸上拍干。

注：洗涤第五次后，可揭掉底板，用纯化水洗涤膜底面及底板，用吸水纸小心吸干水迹，避免划破底膜，合上底板，然后在洗板第六次，保证实验本底干净。

10. 显色

每孔加入 100 μL 的先配制的 AEC 显色液，室温避光孵育 5-15 分钟，根据产成斑点情况选择终止显色时间。

注：显色时间过长会导致实验孔内背景颜色变深。

11. 终止

弃掉孔内液体，揭开板底座，用纯化水洗涤正反面及底座 3-5 遍，终止显色。将板子放置在室温阴凉处，自然晾干后，合上底座。

12. 计数

可使用斑点分析仪或是显微镜进行斑点计数以及分析。

【精密度】

用 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 CD3 抗体刺激 5×10^4 cells/well PBMC，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱刺激 20 h，重复 6 孔，以此评价批间/批内精密度。

Well	Number of Spots Counted		
	Batch-1	Batch-2	Batch-3
1	462	499	400
2	474	507	491
3	422	420	335
4	497	490	388
5	383	291	401
6	380	384	372
Intra-assay-Mean	436	432	398
Intra-assay-SD	49.0	84.6	51.8

Intra-assay-CV%	11%	20%	13%
Inter-assay-Mean	422		
Inter-assay-SD	21.0		
Inter-assay-CV%	5%		

【注意事项】

1. 本产品仅供科研使用，不能用于治疗 and 诊断。
2. 请严格按使用说明进行操作，个别实验步骤为无菌操作。板底部附有 PVDF 膜，加液时枪头切勿碰底，以免划损 PVDF 膜。
3. 不可与其他厂家试剂混用。本试剂盒不同批号的试剂不能混用。
4. 使用前各组份需平衡至室温，保证溶液晶体全部溶解。
5. 试剂盒请在 2-8°C 保存，请勿使用过有效期的试剂盒，开封后的试剂盒尽量一次性使用完。

【常见问题及解决】

现象	原因分析	改进措施
膜背景颜色较深	1.洗板不彻底； 2.PVDF 膜没有干透。	1.提高洗板次数，保证浸泡时长； 2.PVDF 膜干透后再读板。
斑点形状不规则，成团严重。	1.细胞破碎； 2.细胞成团。	1.优化细胞分离工艺，确保细胞活性； 2.细胞悬液充分混匀，确保呈单细胞状态。
阳性对照斑点颜色浅，较模糊。	1.酶活力下降； 2.显色试剂温度低，出现氧化现象； 3.刺激物效价低。	1.提高酶浓度； 2.显色试剂使用前平衡至室温，勿使用已出现氧化沉淀的试剂； 3.提高刺激物浓度。
斑点大小不一，颜色深浅差异大。	阳性对照出现此现象时，细胞状态参差不齐，存活率低。	1.优化细胞分离工艺，确保细胞活性； 2.加强细胞洗涤，去除死细胞。
	阳性对照正常时，刺激物特异性程度低。	更换刺激物
斑点数较少	阳性对照正常时，刺激物特异性问题，正常细胞应答水平低。	1.改变刺激物浓度； 2.提高试验孔的细胞数量。
	阳性对照斑点少时，加入的存活细胞数太少。	1.增加细胞总量； 2.进行活性计数，提高细胞活性。
斑点数太多	细胞数过量。	降低细胞使用量。