

达优

Human TNF- α Precoated ELISPOT Kit

Cat#:2117202

ELISPOT 试剂盒 说明书

本试剂盒仅供科研使用，请勿用于诊断
使用前请仔细阅读说明书并检查试剂盒组分

Human TNF- α

Precoated ELISPOT Kit

Cat#:2117202

ELISPOT 试剂盒

| 产品简介

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°C~8°C 可存放 12 个月。

达优系列 ELISPOT 预包被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。

| 知识背景

TNF- α 即肿瘤坏死因子 α , 是 TNF 超家族的配体, 它是一种多效细胞分子, 在炎症、细胞凋亡和免疫系统发育中起着核心作用。TNF- α 由巨噬细胞、单核细胞、中性粒细胞、CD4 + T 细胞、NK 细胞分泌。TNF- α 可通过激活中性粒细胞和血小板、增强巨噬细胞/NK 细胞的杀伤能力以及刺激免疫系统来增强感染抵抗力, 还可在多种自身免疫性疾病中发挥病理作用。

试剂盒提供的试剂、规格

产品名称	货号	试剂组分名称	规格	数量
Human TNF- α Precoated ELISPOT Kit	2117202	Biotinylated Antibody	100 μ L	1 支
		Streptavidin-HRP	100 μ L	1 支
		Dilution Buffer R (1 \times)	10 mL	2 瓶
		Washing Buffer (50 \times)	15 mL	1 瓶
		AEC Dilution	10 mL	1 瓶
		AEC Solution I (20 \times)	500 μ L	1 支
		AEC Solution II (20 \times)	500 μ L	1 支
		AEC Solution III (200 \times)	50 μ L	1 支
		阳性刺激物	50 T	1 瓶
		预包被 PVDF 板	/	1 块

试剂盒的存放

未开封试剂盒在 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C可稳定保存 12 个月；开封后一次性用完。

需自备的材料设备

- + RPMI-1640 基础培养基（需要添加双抗）
- + 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。
- + 超净工作台

- + CO₂ 细胞培养箱
- + 微量移液器及配套 Tip 头
- + 8 通道微量移液器
- + 0.5 mL, 1.5 mL EP 管
- + 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；按标签重悬即为工作液。
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 μ L/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 μ L/well。

正对照孔：细胞浓度可采用 2×10^4 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 $\mu\text{L}/\text{well}$ ，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 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 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 培养箱静置培养 16~24 小时。孵育期间避免晃动，为防止蒸发，可根据实验室条件增加防蒸发措施。例如使用锡纸把板条包裹后进行孵育，包裹时需底部平整。

第二天：培养后操作（不再需要无菌操作）

● 试剂配制

1. **注意**：各组分 1 \times 工作液及显色液现配现用。

2. **Washing Buffer (50 \times)**：用去离子水稀释（1：50），制成 1 \times Washing Buffer 工作液备用。

3. **生物素标记的抗体 (Biotinylated Antibody)**：用 1 \times Dilution Buffer R 工作液稀释（1：100），制成 1 \times Biotinylated Antibody 工

作液。

4. **酶联亲和素 (Streptavidin-HRP)** : 用 1×Dilution Buffer R 工作液稀释 (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**: 倾倒入孔内细胞及培养基。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°C，建议在 37°C孵育箱做显色，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 μ L 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。

| 注意事项及提示性说明

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)** 有少量沉淀为正常的蛋白饱和析出，用前静置沉降，取用上清即可，不影响实验结果。

3. **AEC 底物的使用：**AEC 底物现用现配，颠倒混匀，并在半个小时内使用；避免使用聚苯乙烯（PS）材料的容器盛放；若正常使用试剂发生析出，加样过程中，间隔性混匀试剂，轻微析出不影响实验结果，同时注意避光。

4. 试剂盒恢复室温所使用的样品来源于人体，所有的样品都应考虑到潜在的危险。对所有样品及其成分的处理、使用、储存和放置都应遵守国家的有关规定。

5. 试剂中含有生物防腐剂，可能导致皮肤过敏。使用时应避免接触皮肤，操作时佩戴合适的手套。

6. 显色底物溶液对眼睛、呼吸系统和皮肤有刺激。呼吸吸入、皮肤接触或口腔摄入有害。使用时应避免吸入蒸汽和喷射物，避免皮肤和眼睛接触，应使用合适的防护服、眼镜和采取皮肤保护设施。

至臻品质 · 至善服务

北京行健雅生物技术有限公司（该产品由深圳市达科为生物工程有限公司监制）

网址： www.dakewe.com

电话： 010-57794997

邮箱： xing_jianya@dakewe.net

地址： 北京市大兴区中关村科技园区大兴生物医药产业基地华佗路 50 号院 1 号楼 301