

## 小鼠肿瘤坏死因子 $\alpha$ ELISPOT试剂盒

### 【产品名称】

小鼠肿瘤坏死因子 $\alpha$  ELISPOT试剂盒

### 【规格】

96 Tests

### 【货号】

RAS-SP004

### 【预期用途】

本试剂盒用于定量测定细胞释放小鼠肿瘤坏死因子 $\alpha$ 的频率。

### 【检测原理】

本试剂盒采用夹心法。PVDF膜微孔板预包被了Anti-TNF- $\alpha$  Antibody，细胞分泌的TNF- $\alpha$ 与微孔板上固定的Anti-TNF- $\alpha$  Antibody结合，然后加入Biotin-Anti-TNF- $\alpha$  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
RSP004-C01	Pre-coated Anti-TNF- $\alpha$ Antibody Microplate	1 plate	固体	2-8°C	2-8°C
RSP004-C02	Positive Stimulus	20 $\mu$ g	冻干粉	2-8°C, 避光	-70°C, 避光
RSP004-C03	Biotin-Anti-TNF- $\alpha$ Antibody	50 $\mu$ L	液体	2-8°C	2-8°C

RSP004-C04	Streptavidin-HRP	50 $\mu$ L	液体	2-8 $^{\circ}$ C	2-8 $^{\circ}$ C
RSP004-C05	Washing Buffer (10 $\times$ )	50 mL	液体	2-8 $^{\circ}$ C	2-8 $^{\circ}$ C
RSP004-C06	Dilution Buffer (1 $\times$ )	50 mL	液体	2-8 $^{\circ}$ C	2-8 $^{\circ}$ C
RSP004-C07	AEC Dilution	25 mL	液体	2-8 $^{\circ}$ C	2-8 $^{\circ}$ C
RSP004-C08	AEC Solution A (20 $\times$ )	0.8 mL	液体	2-8 $^{\circ}$ C, 避光	2-8 $^{\circ}$ C, 避光
RSP004-C09	AEC Solution B (20 $\times$ )	0.8 mL	液体	2-8 $^{\circ}$ C	2-8 $^{\circ}$ C
RSP004-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，有效期见外包装盒标签。
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. CO<sub>2</sub>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.
RSP004-C02	Positive Stimulus	20 µg	100 µL 无菌水	200 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-TNF-α Antibody工作液:

用Dilution Buffer (1×)将Biotin-Anti-TNF-α Antibody稀释2000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30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50 µL的刺激物，然后加入50 µL的细胞悬液，其中：

- a. 阳性对照孔：细胞浓度可采用  $5 \times 10^4$  cells/well，阳性刺激物的孔内终浓度 0.1 µg/mL（用基础

培养基将 200 µg/mL 的阳性刺激物稀释至 0.2 µg/mL)。

b. 阴性对照孔：细胞浓度可采用  $5 \times 10^4$  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<sub>2</sub>培养箱中，平放静置培养20-48 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×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°C放置5-10分钟低渗裂解细胞，有助于洗板效果。

#### 6. 加 Biotin-Anti-TNF-α Antibody

在对应板孔内加入100 µL稀释的Biotin-Anti-TNF-α Antibody（1:2000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×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×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  $\mu$ L的先配制的AEC显色液，室温避光孵育5-30 min，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 0.1  $\mu$ g/mL 的 LPS 刺激  $5 \times 10^4$  cells/well Mouse Spleen Cells，在 37°C，5% CO<sub>2</sub> 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	267	261	230
2	295	310	289
3	327	319	335
4	330	328	310
5	335	344	312
6	340	317	311
Intra-assay-Mean	316	313	298
Intra-assay-SD	28.619	28.110	36.285
Intra-assay-CV%	9.1%	9.0%	12.2%
Inter-assay-Mean	309		
Inter-assay-SD	30.436		
Inter-assay-CV%	9.9%		

## 【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℃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	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 洗板不彻底；</li> <li>2. PVDF 膜没有干透。</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 提高洗板次数，保证浸泡时长；</li> <li>2. PVDF 膜干透后再读板。</li> </ol>
斑点形状不规则，成团严重。	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 细胞破碎；</li> <li>2. 细胞成团。</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 优化细胞分离工艺，确保细胞活性；</li> <li>2. 细胞悬液充分混匀，确保呈单细胞状态。</li> </ol>
阳性对照斑点颜色浅，较模糊。	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 酶活力下降；</li> <li>2. 显色试剂温度低，出现氧化现象</li> <li>3. 刺激物效价低。</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 提高酶浓度；</li> <li>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；</li> <li>3. 提高刺激物浓度。</li> </ol>
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。	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 优化细胞分离工艺，确保细胞活性；</li> <li>2. 加强细胞洗涤，去除死细胞。</li> </ol>
	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。	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 改变刺激物浓度；</li> <li>2. 提高试验孔的细胞数量。</li> </ol>
	阳性对照斑点少时，加入的存活细胞数太少。	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 增加细胞总量；</li> <li>2. 进行活性计数，提高细胞活性。</li> </ol>
斑点数太多	细胞数过量。	降低细胞使用量。