

小鼠 TNF-alpha ELISpot Kit 酶联免疫斑点试剂盒

货号：EIS06460Mu

别名：TNF- α , TNFA, TNF

保存条件：-20°C；短期可 4°C保存，最长不超过 2 周

用途：用于**定量检测分泌小鼠 TNF-alpha 的细胞频率**

规格：96T

有效期：-20°C条件下保存 12 个月

小鼠 TNF-alpha ELISpot Kit 酶联免疫斑点试剂盒检测原理

小鼠 TNF-alpha ELISpot 试剂盒是基于微孔板、高灵敏度的检测方法，用于**检测细胞因子分泌细胞**。本试剂盒为完整的微孔板免疫检测体系，用于**识别和计数分泌细胞因子或其他抗原的单细胞**。该方法灵敏度极高，即使细胞频率低于 1/100,000，也可对活跃分泌细胞进行定量。与其他评估抗原特异性免疫细胞应答的方法不同，本方法**无需在体外预先扩增细胞**，适用于高通量检测。小鼠 TNF-alpha ELISpot 试剂盒为完整检测体系，无需额外优化或配制。小鼠 TNF-alpha ELISpot 试剂盒使用**包被有抗体的膜底微孔板**来识别分泌细胞。包被在板上的捕获抗体可结合其周围细胞分泌的细胞因子，再通过酶结合物对分泌的蛋白进行显色。在细胞因子所在位置形成有色沉淀，表现为**斑点**，**每个斑点代表一个分泌细胞因子的单细胞**。

自备器材

- 1.解剖显微镜或 ELISpot 读板仪
- 2.移液器及吸头
- 3.去离子水
- 4.洗瓶、多通道分液仪或全自动酶标洗板机
- 5.500 mL 量筒
- 6.37 °C CO₂ 培养箱
- 7.无菌培养液

小鼠 TNF-alpha ELISpot Kit 酶联免疫斑点试剂盒组分

组分名称	96 T	48 T	保存条件
预包被酶标板	8×12	8×6	4°C / -20°C
阳性对照品	2 瓶	1 瓶	4°C / -20°C
生物素化抗体 (1:100)	1 瓶	1 瓶	4°C / -20°C
酶结合物 (1:100)	1 瓶	1 瓶	4°C / -20°C
抗体稀释液	1 瓶	1 瓶	4°C / -20°C
酶稀释液	1 瓶	1 瓶	4°C / -20°C
洗涤液 (1:25)	1 瓶	1 瓶	4°C / -20°C
显色液 (BCIP/NBT 底物)	1 瓶	1 瓶	4°C / -20°C

试剂配制

洗涤液：浓缩洗涤液用双蒸水按 1:25 稀释，未用完的试剂放回试剂盒保存。

小鼠 TNF-alpha ELISpot 阳性对照：冻干粉阳性对照用 300 μL 细胞培养液复溶。

小鼠 TNF-alpha ELISpot 检测抗体工作液：根据待检孔数取适量生物素化抗体，用抗体稀释液按 1:100 稀释，充分混匀。提前 30 分钟配制，**稀释后不可重复使用。**

链霉亲和素-碱性磷酸酶 (Streptavidin-AP) 工作液：根据待检孔数取适量酶结合物，用酶稀释液按 1:100 稀释，充分混匀。提前 30 分钟配制，**稀释后不可重复使用。**

样本制备

效应细胞、反应细胞的种类、细胞分离方法、刺激方式及孵育时间由研究者自行确定。

实验步骤

除稀释后的检测抗体混合液需置于 2 ~ 8°C 保存外，其余试剂均恢复至室温使用。所有样本和对照均建议至少做**复孔**检测。

1. 每孔加入 200 μL 无菌培养液，室温孵育约 20 分钟。
2. 细胞准备好后，弃去孔内培养液，立即每孔加入 100 μL 相应细胞悬液，对照孔加入阳性对照品溶液重悬的细胞。
3. 将酶标板置于 37°C、CO₂ 恒温、湿润培养箱中孵育。最佳孵育时间由研究者根据刺激条件确定，孵育期间请勿扰动细胞。

4. 弃去孔内液体，进行洗涤，重复洗涤 3 次，共洗涤 4 次。用洗瓶、多通道分液仪或自动洗板机，每孔加入 250 ~ 300 μL 洗涤液。每步均需彻底弃净液体，以保证实验效果。最后一次洗涤后，充分吸弃或倾去残留洗涤液，将酶标板倒置，在洁净吸水纸上拍干。
5. 每孔加入 100 μL 稀释后的检测抗体工作液，2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜；或室温置于摇床上孵育 2 小时。
6. 重复步骤 4 的洗涤程序。
7. 每孔加入 100 μL 链霉亲和素-AP 工作液，室温孵育 2 小时。
8. 重复步骤 4 的洗涤程序。
9. 每孔加入 100 μL BCIP/NBT 底物液，室温避光孵育 1 小时。
10. 弃去底物液，用去离子水冲洗酶标板。倒置拍干，取下酶标板底部的塑料底板，用纸巾彻底擦拭板面，室温晾干 60 ~ 90 分钟或 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘干 15 ~ 30 分钟。

结果计算

可通过**解剖显微镜**或 **ELISpot 读板仪**计数斑点，对显色后的酶标板进行结果判读。特异性斑点呈圆形，中心颜色较深，边缘略弥散。可对结果进行定量分析。

重复性数据

按照实验步骤将样本在 **8 个孔**中进行检测，并使用解剖显微镜进行判读分析。

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8
计数斑点数	387	397	310	318	381	400	302	403

注意事项

1. 复溶后的阳性对照不可保存，一旦复溶严禁再次冻存。
2. 因运输过程中振荡或倒置，需将试剂盒内试剂管 / 瓶进行离心，使内容物沉至管底。可手动涡旋混匀，或以 1000 rpm 离心 1 分钟。
3. 浓缩洗涤液可能出现轻微结晶，稀释时可水浴加热助溶，使用前必须确保结晶完全溶解。
4. 配制好的阳性对照仅限一次性使用，已用于实验的对照不可重复使用。如需重复实验，请使用另一瓶对照。
5. 仅使用本试剂盒配套试剂及组分，不得混用不同批次、不同订单或不同型号试剂盒的组分。
6. 确保所有试剂充分混匀，加入酶标板的试剂必须混匀，这是获得准确结果的关键。

7. 实验开始前，将试剂盒恢复至室温。
8. 短期使用的未用完酶标板条，应放回原铝箔袋中，于 2 ~ 8℃ 保存。
9. 过期试剂盒严禁使用。
10. 所有样本、洗涤液及废弃物均按生物危害性废物处理。
11. 必须使用经校准的移液器或类似仪器加样，实验前校准仪器以避免误差。快速加样，总加样时间控制在 5 分钟内，建议使用多道移液器。
12. 定期校准培养箱，确保 37℃ 孵育温度稳定
13. 48 孔 ELISpot 试剂盒中，所有组分体积均为 96 孔试剂盒的 50%。