

ExCell Bio

MOUSE IFN- γ ELISA KIT

User Manual

Catalog Number EM007-48

EM007-96



产品概述

干扰素 γ (IFN- γ , 也称为 II 型干扰素) 原本被认定为是一种抗病毒活性所产生的促有丝分裂原激活 T 淋巴细胞。蛋白质的组成与干扰素 β 或各种干扰素 α 家族蛋白没有显著的同源性。干扰素 γ 主要通过 T 淋巴细胞和自然杀伤细胞产生。干扰素 γ 的生产是由抗原的刺激和细胞因子引起, 如 IL-12 (白细胞介素 12)。小鼠的干扰素 γ 编码 155 个氨基酸残基的前体蛋白与疏水信号肽, 后者是裂解出的 133 氨基酸残基的成熟蛋白。在溶液中, 干扰素 γ 显示存在一个非共价连接的同型二聚体与 IL-10 (白细胞介素 10) 极为相似。鼠的干扰素 γ 显示, 大约 40 % 氨基酸残基与人的干扰素 γ 同源, 没有种属的交叉反应。

产品原理

本实验采用双抗体夹心 ELISA 法。抗小鼠 IFN- γ 单抗包被于酶标板上, 同时加入标本、标准品和生物素化的抗小鼠 IFN- γ 抗体, 标本、标准品中的 IFN- γ 会与加入于孔中的生物素化的抗小鼠 IFN- γ 抗体及包被于酶标板上的单抗结合, 形成免疫复合物, 游离的成分被洗去; 加入辣根过氧化物酶标记的亲合素, 亲合素与生物素特异性结合, 游离的成分被洗去。加入显色底物 (显色剂), 若反应孔中有 IFN- γ , 辣根过氧化物酶会使无色的显色剂变蓝, 加终止液变黄。在 450nm 处测 OD 值, IFN- γ 浓度与 OD₄₅₀ 值之间呈正相关, 可通过绘制标准曲线求出标本中 IFN- γ 浓度。

产品性能

1. 灵敏度: 最小可测小鼠 IFN- γ 达 4 pg/ml。
2. 重复性: 板内、板间变异系数均 < 10%。

产品应用

本产品适用于体外定量检测小鼠血清、血浆、组织或细胞培养上清液中天然和重组的 IFN- γ 浓度。


产品规格

货号	品名	规格
EM007-48	MOUSE IFN- γ ELISA KIT	48T
EM007-96	MOUSE IFN- γ ELISA KIT	96T


产品组分及储存条件

名称	96 Tests	48 Tests	保存条件
1. 抗体包被板条 (Microwell Plate)	8×12	8×6	2-8°C
2. 标准品 (Standard)	2 支 (冻干)	1 支 (冻干)	2-8°C
3. 浓缩生物素化抗体 100× (Biotin-Conjugate)	2 支 (30 μ l/支)	1 支 (30 μ l/支)	2-8°C
4. 浓缩酶结合物 100× (Streptavidin-HRP)	2 支 (60 μ l/支)	1 支 (60 μ l/支)	2-8°C (避光)
5. 试剂稀释液 (Assay Diluent)	2 瓶 (25ml/瓶)	1 瓶 (25ml/瓶)	2-8°C
6. 浓缩洗涤液 20× (Wash Buffer Concentrate)	1 瓶 (30ml/瓶)	1 瓶 (30ml/瓶)	2-8°C
7. 显色剂 (Substrate Solution)	1 瓶 (12ml/瓶)	1 瓶 (6ml/瓶)	2-8°C (避光)
8. 终止液 (Stop Solution)	1 瓶 (12ml/瓶)	1 瓶 (12ml/瓶)	2-8°C
9. 封板胶纸	2 张	2 张	
10. 说明书	1 份	1 份	

试验所需自备仪器和试剂:

1. 酶标仪(450nm 检测波长滤光片, 570nm 或 630nm 校正波长滤光片)。
2. 高精度加液器及一次性吸头: 0.5-10 μ l, 2-20 μ l, 20-200 μ l, 200-1000 μ l。
3. 37 $^{\circ}$ C恒温箱、蒸馏水或去离子水、坐标纸。

1 实验流程

一. 标本收集

1. 收集血液的试管应为一次性的无热原, 无内毒素试管。
2. 血浆抗凝剂推荐使用 EDTA。避免使用溶血, 高血脂标本。
3. 标本应清澈透明, 悬浮物应离心去除。
4. 标本收集后若不及时检测, 需按一次使用量分装, 冻存于-20 $^{\circ}$ C, -70 $^{\circ}$ C电冰箱内, 避免反复冻融。
5. 可根据标本的实际情况, 做适当倍数稀释(建议做预实验, 以确定稀释倍数)。

注: 血清或血浆样本冻存后聚合的蛋白会遮盖抗原的表位, 建议用试剂稀释液将血清或血浆样本做 1:2 (样本 50 μ l, 加试剂稀释液 50 μ l) 稀释后检测。计算样本含量时应乘以稀释倍数 ($\times 2$)。

血清样本收集:

全血标本室温放置 2 小时或是 4 度过夜后于 2-8 度 1000x g 离心 15min, 取上清即可立即检测。或保存于-20 度/-80 度冰箱。避免反复冻融。

血浆样本收集:

加入抗凝剂后(血浆样本需要抗凝), 标本采集后 30min 内于 2-8 度 1000x g 离心 15min, 取上清即可立即检测, 或保存于-20 度/-80 度冰箱。避免反复冻融。

细胞上清收集:

将细胞培养液于 2-8 度 1000 x g 离心 15 分钟取上清。上清立即用于实验, 或保存于-20 度/-80 度冰箱。避免反复冻融。

组织样本处理:

1. 组织用预冷的生理盐水或 PBS(0.15M、pH7.2)漂洗，去除血液，并用滤纸拭干，剔除附属的结缔组织，称重。
2. 用眼科手术剪尽快剪碎组织块，加 PBS(0.15M、pH7.2)或 0.9%生理盐水，浓度建议 1g (组织湿重) /ml。
3. 匀浆：方式有多种
 - a) 手工匀浆：将剪碎的组织放入预冷的研钵中，充分研碎，使组织匀浆化；为方便研磨，也可将剪成小块的组织直接在液氮中放置后，再放到研钵中研磨。
 - b) 机器匀浆：用组织捣碎机 10000~15000r/min 上下研磨制成组织匀浆，也可用内切式组织匀浆机制备（匀浆时间 10 秒/次，间隙 30 秒，连续 3~5 次），皮肤、肌肉组织等可延长匀浆时间。
 - c) 有些组织：如肝、肾、脑组织液可以用超声粉碎的方法制备组织匀浆。为防止蛋白质降解，以上操作均需要在冰上操作。
4. 将制备好的组织匀浆离心，4 °C10000rpm，离心 10min，弃下面沉淀，留取上清。
5. 将组织匀浆上清分装，冻存，备用。建议放-20 °C 或者-70 °C保存；使用时充分解冻并混匀。
6. 根据实验需要，取适量上清液进行各种 ELISA 测定。检测样本稀释倍数需要进行摸索，可设置不同倍数进行预实验。稀释液建议使用试剂盒中的样品稀释液。

二. 检测前准备工作

1. 请提前20分钟从冰箱中取出试剂盒，以平衡至室温。
2. 将浓缩洗涤液用双蒸水稀释（1:20）。未用完的放回4°C。
3. 标准品：加入试剂稀释液至冻干标准品中，使其浓度为1000pg/mL，静置15分钟，待其充分溶解后，轻轻混匀。然后根据需要进行稀释。（建议标准曲线使用以下浓度：1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625、0 pg/ml）。

注：复溶标准品原液（1000 pg/ml）若未用完请分装后放入-20°C以下冰箱内保存，保存两个月。已稀释的标准品请废弃。

- 4.生物素化抗体工作液：按当次试验所需用量，用试剂稀释液稀释浓缩生物素化抗体(1:100)配置成生物素化抗体工作液。使用前30分钟准备。仅供当日使用。

5.酶结合物工作液：按当次试验所需要用量，用试剂稀释液稀释浓缩酶结合物(1:100)配置成酶结合物工作液。使用前30分钟准备。仅供当日使用。

三. 洗涤方法

1. 自动洗板机：要求注入的洗涤液为350 μ l，注入与吸出间隔20—30秒。
2. 手工洗板：每孔加洗涤液350 μ l，静置30秒后甩尽孔内液体，在厚透吸水纸上拍干。

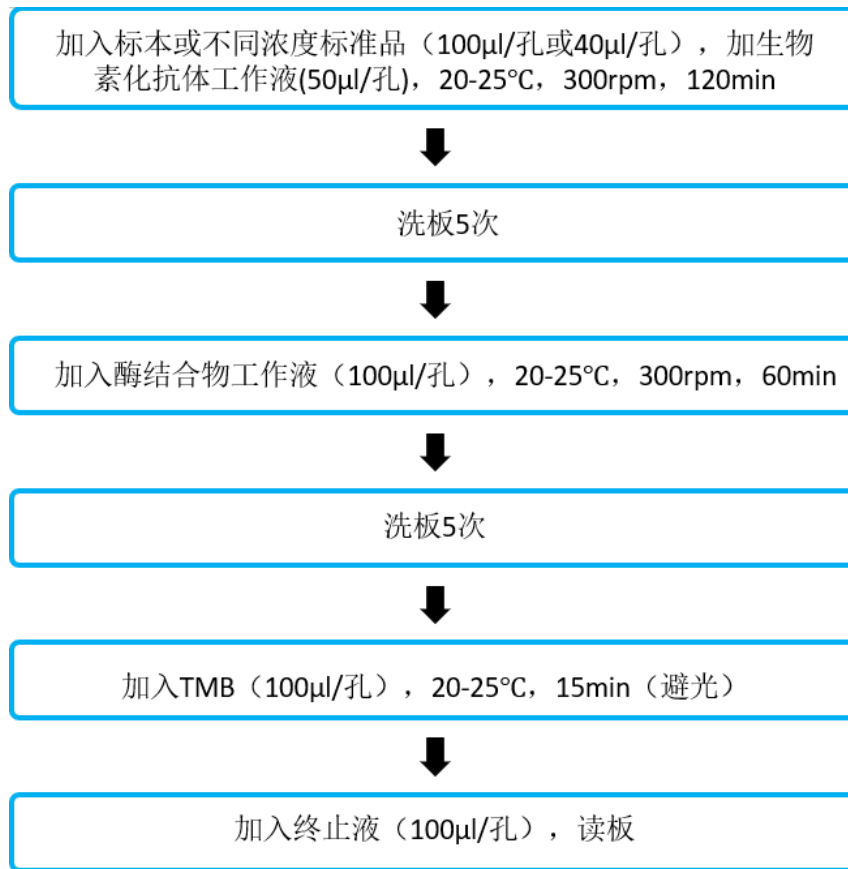
四. 操作步骤

1. 从已平衡至室温的密封袋中取出试验所需板条，未用的板条和干燥剂请放回铝箔袋内封存于 4 $^{\circ}$ C。
2. 留空白孔（若使用双波长读板，空白孔可以不设）。
3. 提前准备好样本、标准品和生物素化抗体工作液。
4. 分别将标本或不同浓度标准品（0pg/ml 孔加试剂稀释液）加入相应孔中(100 μ l/孔)，若样本体积较少，这个试剂盒可做微量法检测，即标准品 40 μ l/Well，样本 40 μ l/Well。

随后在样本和标准品孔中加入 50 μ l 生物素化抗体工作液，用封板胶纸封住反应孔。

5. 室温（20~25 $^{\circ}$ C）孵育 120 分钟。使用微量振荡器(频率，300rpm)。
6. 提前 30 分钟制备酶结合物工作液。室温避光放置。
7. 洗板 5 次。
8. 除空白孔外，加入酶结合物工作液(100 μ l/孔)。用封板胶纸封住反应孔。
9. 室温（20~25 $^{\circ}$ C），孵育 60 分钟。使用微量振荡器(频率，300rpm)。
10. 洗板 5 次。
11. 加入显色底物（包括空白孔）100 μ l/孔，室温（20~25 $^{\circ}$ C），避光孵育 15 分钟。
12. 加入终止液（包括空白孔）100 μ l/孔，混匀后即刻测量 OD₄₅₀ 值(10 分钟内)。

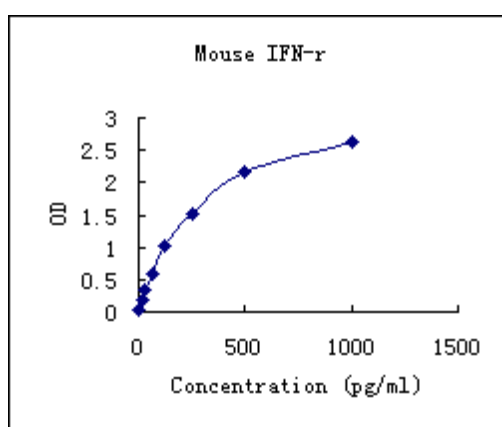
五. 操作流程图



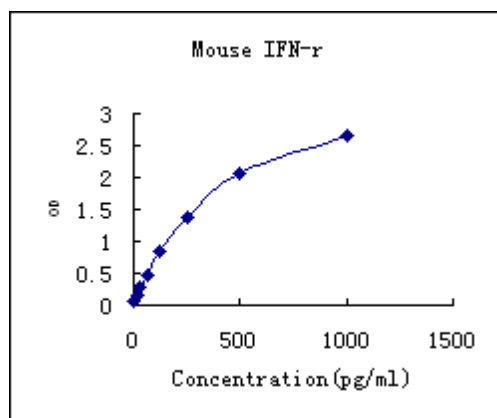
结果分析

1. 每个标准品和标本的 OD 值应减去零孔的 OD 值。（若双波长读板，可不需要减去零孔值）。
2. 绘制标准曲线。以标准品浓度作横坐标，OD 值作纵坐标，以平滑线连接各标准品的坐标点。通过样本的 OD 值可在标准曲线上计算出其浓度。
3. 若标本 OD 值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测，计算浓度时应乘以稀释倍数。

检测数据: 100ul/Well	
Standard	OD
1000	2.641
500	2.164
250	1.515
125	1.029
62.5	0.597
31.25	0.341
15.625	0.191
0	0.038



微量检测数据: 40ul/Well	
Standard	OD
1000	2.671
500	2.063
250	1.376
125	0.837
62.5	0.474
31.25	0.268
15.625	0.162
0	0.048



注意：本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线计算标本含量。

备注

1. 试剂盒使用前请保存在 2-8℃。除复溶后的标准品，其他成分不可冻结。

2. 浓缩生物素化抗体，浓缩酶结合物体积小，运输中颠簸和可能的倒置，会使液体沾到管壁或瓶盖。因此使用前请用手甩几下或 1000rpm 离心 1 分钟，以使附着管壁或瓶盖的液体沉积到管底。
3. 从冰箱取出的浓缩洗涤液可能有结晶，属正常现象，微加热至 40°C 使结晶完全溶解后再配制洗涤液。
4. 若需分次使用标准品，在其复溶后应按每次用量分装，将其放在 -20 或 -70°C 贮存，避免反复冻融。
5. 不同批号的试剂盒组份不能混用（洗涤液和反应终止液除外）。
6. 充分轻微混匀对反应结果尤为重要，要保证加入到孔内的液体是均一的液体。
7. 酶免试验中标准品和样本检测时建议作复孔。

常见问题及解答

Q1: 标准品 OD 值低

A: 可能原因:

- 1、溶解标准品以及配置生物素标记抗体、浓缩酶结合物时需要采用试剂盒内的试剂稀释液，若采用双蒸水可导致蛋白失活。
- 2、若标准品是粉末状，需加入稀释液之后防止至少 15min 之后才能使用。
- 3、严格根据说明书中的温度进行实验，实验过程中需要用微量振荡器的步骤必须使用。
- 4、严格按照试剂盒建议的波长的读板。
- 5、洗板时间不宜过长。

Q2: 出现“白板”

A: 可能原因:

- 1、若客户买的试剂盒品种 ≥ 2 时需要确认未使用错板条。我们试剂盒内的酶标板都画有颜色，客户可根据颜色区别不同的品种。
- 2、漏加生物素化的抗体工作液或酶结合物工作液。

Q3: 正常的 TMB 应该是什么颜色?

A: 正常的 TMB 应该是无色，若发现 TMB 变成微蓝色，请弃用。

Q4: 如何决定样本的稀释倍数?

A: 来自于正常个体的血清或血浆建议按照说明书提示稀释，若有非正常个体样本，为了结果的有效性以及降低实验风险程度建议客户做预实验决定样本的稀释倍数。

Q5: 样本 CV 值差异大

A: 可能原因:

- 1、若样本需要稀释检测的比例很大，例如 1:100，建议客户先 1:10 再 1:10 稀释。切勿直接在 1 μ l 的样本加入到 99 μ l 的试剂稀释液中。
- 2、将液体加入到孔中时每次的操作手法要一致。