

## Rat Interferon $\gamma$ ELISA Kit

### 大鼠 $\gamma$ 干扰素 ELISA 试剂盒

产品编号: EK0374

规格: 96T

检测范围: 31.2pg/ml→2000pg/ml

敏感性: <6pg/ml

特异性: 系统和其它细胞因子无交叉反应。

保存: 2-8℃ (频繁使用时); -20℃ (长时间不用时)。

有效期: 6个月(4℃); 12个月(-20℃)。

用途: 用于体外定量分析大鼠血清、细胞裂解液、细胞培养上清。

#### 工作原理

Interferon gamma, IFN  $\gamma$ 。  $\gamma$  干扰素。由受同种抗原、肿瘤、和分裂因子刺激的活化 T 细胞 NK 细胞所分泌。IFN  $\gamma$  具有一系列的生物学功能: 抗病毒作用; 抑制肿瘤细胞生长; 促进 B 细胞产生抗体。此外, IFN  $\gamma$  活化巨噬细胞; 增强 NK 细胞的细胞毒作用; 刺激 T 细胞的细胞毒作用。大鼠的 IFN  $\gamma$  蛋白质有 138 个氨基酸, 本身分子量 15.5KDa。根据糖化程度不同, 分子量约 20-25KDa。

博士德所提供的大鼠 IFN  $\gamma$  ELISA Kit 是典型的夹心法酶联免疫吸附测定试剂盒 (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay, ELISA)。预先包被的抗体是单克隆抗, 克隆号 88928; 检测相抗体为多克隆抗体。检测抗体经生物素 (biotin) 标记。样品和生物素标记抗体先后加入酶标板孔反应后, PBS 或 TBS 洗涤。随后加入过氧化物酶标记的亲合素反应; 经过 PBS 或 TBS 的彻底洗涤后用底物 TMB 显色。TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色, 并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的大鼠 IFN  $\gamma$  呈正相关。

#### 试剂盒中内容 (96 孔)

内容	规格	数量
预包被抗大鼠 IFN $\gamma$ 抗体的 96 孔板	96T	1 板
重组大鼠 IFN $\gamma$ 冻干标准品	10ng/管	2 管
生物素标记抗大鼠 IFN $\gamma$ (100X)	100ul	1 管
亲和素-过氧化物酶复合物 (ABC) (100X)	100ul	1 管
样品稀释液	30ml	1 瓶
抗体稀释液	12ml	1 瓶
ABC 稀释液	12ml	1 瓶
TMB 显色液	10ml	1 瓶
终止液	10ml	1 瓶
洗涤缓冲液(25X)	20ml	1 瓶
封板膜		4 张

**注意: 使用前请检查试剂盒中试剂的标签和数量与表格是否一致**



## 需要而未提供的试剂和器材

1. 标准规格酶标仪。
2. 自动洗板机。
3. 恒温箱
4. 系列可调节移液器及吸头，一次检测样品较多时，最好用多通道移液器。
5. 干净的试管和 Eppendorf 管。
6. 用去离子水将 25X 洗涤缓冲液稀释 25 倍，成 1X 洗涤缓冲液。

## 注意事项

1. 使用前 TMB 显色液应为无色透明溶液，若发现颜色异常，请及时与厂家联系。
2. 用户在初次使用试剂盒时，应将各种试剂管离心数分钟，以便试剂集中到管底。
3. 要严格避免操作过程中酶标板干燥。干燥会使酶标板上生物成份迅速失活。
4. 为免交叉污染，要避免重复使用手中的吸头和试管。
5. 禁止混用不同批次试剂盒内的试剂。
6. 本公司提供的 96 孔酶标板是单条可拆型酶标板，用户可按需求使用；剩余的酶标板请按保存条件贮存。
7. 揭封板膜和覆盖封板膜时应避免用力过大导致液体溅出。

## 洗板方法

手工洗板方法：吸去（不可触及板壁）或甩掉酶标板内的液体；在实验台上铺垫几层吸水纸，酶标板朝下用力拍几次；将 1X 洗涤缓冲液至少 300ul 注入孔内，浸泡 1-2 分钟。根据需要，重复此过程数次。

自动洗板：如果有自动洗板机，应在熟练使用后再用到正式实验过程中。

## 样品的准备和保存

样品如果不立即分析，应分装后冷冻保存，且避免反复冻融。

血清——用干净试管收集血液，室温凝固 2 小时或 4℃ 过夜，离心 1500×g 15 分钟，收集血清。立即分析或分装后 -20℃ 冷冻保存。

细胞培养上清——离心去除沉淀，立即分析或分装后 -20℃ 冷冻保存。

细胞裂解液——对于贴壁细胞，去除培养液，用 PBS、生理盐水或无血清培养液洗一遍。加入适量裂解液，用枪吹打数下，使裂解液和细胞充分接触。通常 10 秒后，细胞就会被裂解。对于悬浮细胞，离心收集细胞，用 PBS、生理盐水或无血清培养液洗一遍。加入适量裂解液，用枪吹打把细胞吹散，用手指轻弹以充分裂解细胞。充分裂解后，10000—14000g 离心 3-5 分钟，取上清。立即分析或分装后 -20℃ 冷冻保存。

## 样品稀释的一般原则

用户须估计样品待测因子的含量，决定适当的稀释倍数，以使稀释后样品中待测因子的浓度处于 ELISA 试剂盒的最佳检测范围。根据待测因子含量高、中、低的不同，分别采取不同的稀释方案：

高——指待测因子在 20-200ng/ml。一般按 1: 100 稀释。297ul 样品稀释液加 3ul 样品。

中——指待测因子在 2-20ng/ml。一般按 1: 10 稀释。225ul 样品稀释液加 25ul 样品。

低——指待测因子在 31.2-2000pg/ml。按 1: 2 稀释。100ul 样品稀释液加 100ul 样品。

特低——指待测因子 ≤ 31.2pg/ml。样品一般不做稀释，或按 1: 2 稀释。

以上方案仅供参考，样品的稀释应有详细记录。



## 试剂的准备和保存

**A. 大鼠 IFN  $\gamma$  标准品的稀释和使用:** 在使用前 2 小时内准备。

试剂盒提供 2 管标准品, 每管 10ng, 每次使用 1 管。

1. 配制 10,000pg/ml 标准品: 取 1ml 样品稀释液加入标准品管内, 盖好后静置 10 分钟以上, 然后颠倒/搓动以助溶解。
2. 配制 2000pg/ml 标准品: 取 0.2ml 10,000pg/ml 的标准品加入有 0.8ml 样品稀释液的 Eppendorf 管中, 混匀, 做上标记。
3. 配制 1000pg/ml  $\rightarrow$  31.2pg/ml 标准品: 准备 6 只 Eppendorf 管, 每管加 0.3ml 样品稀释液, 分别标记上 1000pg/ml, 500pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 62.5pg/ml, 31.2pg/ml。取 0.3ml 2000pg/ml 的标准品加入标记 1000pg/ml 的管中, 混匀后同样取出 0.3ml, 加入下一只管中。余同此类推, 直到最后一只样品管。

**注意:** 已经稀释的标准品 (10,000pg/ml), 应在 12 小时内使用。-20 $^{\circ}$ C 冷冻保存条件下, 2 天内可以使用, 但不得反复冻融。

**B. 生物素标记抗大鼠 IFN  $\gamma$  抗体工作液:** 在使用前 2 小时内准备。

1. 根据每孔需要 100ul 计算总的用量 (实际配制时应多配制 100-200ul)。
2. 按 1ul 生物素标记抗大鼠 IFN  $\gamma$  加抗体稀释液 99ul 的比例配制工作液。轻轻混匀。

**C. 亲和素-过氧化物酶复合物 (ABC) 工作液的准备:** 在使用前 1 小时内准备。

1. 根据每孔需要 100ul 计算总的用量 (实配时应多配制 100-200ul)。
2. 按 1ul 亲和素-过氧化物酶复合物 (ABC) 加 ABC 稀释液 99ul 的比例配制工作液。轻轻混匀。

## 操作程序

已稀释好的 ABC 和 TMB 显色液在加入酶标板孔前都应预先在 37 $^{\circ}$ C 中平衡至少 30 分钟。试剂或样品稀释时, **切不可忘记混匀**。每次检测都应该做标准曲线。用户须估计样品待测因子的含量, 决定适当的稀释倍数。

1. 确定本次检测所需的已包被抗体的酶标板孔数目, 并增加 1 孔作为 TMB 空白显色孔。总数 = 样品数 + 9; 做双份检测时  $\times 2$ 。其余重包装好放如冰箱中。
2. 将 2000pg/ml, 1000pg/ml, 500pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 62.5pg/ml, 31.2pg/ml 的标准品各 100ul 依次加入一排 7 孔中, 1 孔只加样品稀释液的作为零孔。对于大鼠血清、细胞裂解液、细胞培养上清, 直接加已用样品稀释液稀释的样品 100ul。
3. 酶标板加上封板膜, 37 $^{\circ}$ C 反应 90 分钟。
4. 反应后用自动洗板机吸去酶标板内的液体; 或甩去酶标板内液体, 再对着吸水纸拍几下。不洗。
5. 将准备好的生物素抗大鼠 IFN  $\gamma$  抗体工作液按每孔 100ul 依次加入 (TMB 空白显色孔除外)。酶标板加上封板膜, 37 $^{\circ}$ C 反应 60 分钟。
6. 1X 洗涤缓冲液洗涤 3 次, 每次浸泡 1 分钟左右 (每孔洗液至少 300ul)。吸去或甩去多余液体。
7. 将准备好的 ABC 工作液按每孔 100ul 依次加入 (TMB 空白显色孔除外)。酶标板加上封板膜, 37 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟。



8. 1X 洗涤缓冲液洗涤 5 次，每次浸泡 1-2 分钟左右（每孔洗液至少 300ul）。吸去或甩去多余液体。
9. 按每孔 90ul 依次加入 TMB 显色液，37°C 避光反应 25-30 分钟  
（注意：显色时间供参考，因用户实验室条件差异，最佳显色时间会有所不同。此时肉眼可见标准品的前 3-4 孔有明显的梯度蓝色，后 3-4 孔差别不明显）。
10. 按每孔 100ul 依次加入终止液，此时蓝色立转黄色。
11. 用酶标仪在 450nm 测定 O.D.值。  
有两种设定空白对照的方案：  
（1）将 TMB 空白显色孔(只加 TMB 显色液和终止液)设为对照。所有的标准品和样品的吸光值减去 TMB 空白显色孔的吸光值后，在坐标纸上画出曲线，以吸光值作为纵坐标，以浓度作为横坐标。  
（2）将零孔设为对照。所有的标准品和样品的吸光值减去零孔的吸光值后，得到的数据可以直接在坐标纸上画出曲线。
12. 根据样品的吸光值在坐标上找出对应的浓度。用户也可以使用各种应用软件来计算。应记住由于样品稀释了 N 倍，其实际浓度应该×N。

#### 操作程序总结：

1. 加样品和标准品，37°C 反应 90 分钟。不洗。
2. 加生物素标记抗体，37°C 反应 60 分钟。1X 洗涤缓冲液洗涤 3 次。
3. 加 ABC，37°C 反应 30 分钟。1X 洗涤缓冲液洗涤 5 次。
4. TMB37°C 反应 25-30 分钟。
5. 加入终止液，读数。

#### 典型数据

TMB37°C 反应 25 分钟。

（数据供参考，不同用户最佳显色时间会有所不同）

浓度	0.0pg/ml	31.2pg/ml	62.5pg/ml	125pg/ml	250pg/ml	500pg/ml	1000pg/ml	2000pg/ml
O.D.	0.016	0.088	0.144	0.257	0.557	1.008	1.652	2.144

#### 参考文献

1. Wheelock ef, sibley wa. circulating virus, interferon and antibody after vaccination with the 17-d strain of yellow-fever virus.n engl j med. 1965 jul 22;273:194-8.
2. Wenner CA, Guler ML, Macatonia SE, O'Garra A, Murphy KM. Roles of IFN-gamma and IFN-alpha in IL-12-induced T helper cell-1 development. J Immunol. 1996 Feb 15;156(4):1442-7.
3. Magram J, Connaughton SE, Warriar RR, Carvajal DM, Wu CY, Ferrante J, Stewart C, Sarmiento U, Faherty DA, Gately MK. IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. Immunity. 1996 May;4(5):471-81.
4. Kim HS, Whang SY, Woo MS, Park JS, Kim WK, Han IO. Sodium butyrate suppresses interferon-gamma-, but not lipopolysaccharide-mediated induction of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in microglia.J Neuroimmunol. 2004 Jun;151(1-2):85-93.