

# 小鼠 $\gamma$ 干扰素 (IFN- $\gamma$ ) ELISA Kit

**Catalog Number: bsk12001**

本试剂盒用于定量检测小鼠血清、血浆或细胞培养上清液等样本中  $\gamma$  干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 含量。**使用前请仔细阅读说明书并检查试剂组分**，如有任何疑问请与北京博奥森生物技术有限公司联系，公司将为您提供强有力的技术支持。

**仅供研究，不用于临床诊断。**

## 目录

|                   |   |
|-------------------|---|
| 检测原理.....         | 3 |
| 试剂盒组成.....        | 3 |
| 其它实验材料.....       | 3 |
| 注意事项.....         | 4 |
| 样本收集、处理及保存方法..... | 4 |
| 试剂准备.....         | 5 |
| 操作步骤.....         | 5 |
| 结果判断.....         | 6 |
| 试剂盒性能.....        | 7 |
| 检测范围.....         | 7 |
| 灵敏度.....          | 7 |
| 常见问题分析及解决办法.....  | 8 |

### 检测原理：

本试剂盒采用 ELISA 双抗体夹心法原理。用纯化的  $\gamma$  干扰素（IFN- $\gamma$ ）抗体包被微孔板，向已包被的板微孔中依次加入标准品及待测样本，待其与包被抗体充分结合后，再与生物素化的 IFN- $\gamma$  抗体结合，其后加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的链霉亲和素，生物素与链霉亲和素形成高强度的非共价结合，经过彻底洗涤后加入底物 TMB 显色。TMB 在 HRP 酶的催化作用下转化成蓝色，并在酸的作用下最终转化成黄色。颜色的深浅和样本中的 IFN- $\gamma$  含量呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光值（OD 值），通过绘制标准曲线计算样本中 IFN- $\gamma$  浓度。

### 试剂盒组成：

| 试剂盒组成          | 规格（96T）        | 保存条件    |
|----------------|----------------|---------|
| 抗体包被板条         | 8×12           | 2-8℃ 保存 |
| 标准品            | 2 支            | 2-8℃ 保存 |
| S1 标准品/样本稀释液   | 16 ml×1 瓶      | 2-8℃ 保存 |
| 浓缩生物素化抗体（100×） | 30 $\mu$ l×2 瓶 | 2-8℃ 保存 |
| S2 生物素化抗体稀释液   | 16ml×1 瓶       | 2-8℃ 保存 |
| 浓缩酶结合物（100×）   | 60 $\mu$ l×2 瓶 | 2-8℃ 保存 |
| S3 酶结合物稀释液     | 16ml×1 瓶       | 2-8℃ 保存 |
| 浓缩洗涤液（20×）     | 25ml×1 瓶       | 2-8℃ 保存 |
| 显色底物（避光）       | 12ml×1 瓶       | 2-8℃ 保存 |
| 终止液            | 12ml×1 瓶       | 2-8℃ 保存 |
| 封板胶纸           | 4 张            |         |
| 说明书            | 1 份            |         |

### 其它实验材料（不提供，但可协助购买）：

- 1.酶标仪(主波长 450nm，参考波长 630nm)
- 2.高精度可调移液器（已校准）及吸头：0.5-10,2-20,20-200,200-1000 $\mu$ l。  
一次检测样本较多时，建议使用多通道移液器。
- 3.自动洗板机或洗瓶
- 4.37℃ 温箱
- 5.双蒸水或去离子水

6.坐标纸

7.量筒

**注意事项:**

1.试剂盒保存在 2-8℃，已复溶但未用完的标准品，建议丢弃。不可混合使用不同来源或不同批号的试剂盒组分，请在有效期内使用本产品。

2.浓缩洗涤液低温取出可能会伴有结晶析出，稀释时可在水浴中加热助溶，不影响使用。

3.各步加样均应使用移液器，并经过校准，以免产生误差。建议一次加样时间最好控制在 5 分钟内，如样本数量较多，推荐使用排枪加样。

4.请每次测定的同时做标准曲线，最好做复孔。如样本中待测物质含量高于试剂盒检测上限（样本 OD 值大于标准品孔第一孔的 OD 值），请先用样本稀释液稀释一定的倍数（n 倍）后再测定，计算时需乘以总稀释倍数。

5. 为避免交叉污染，在加入不同浓度的标准品、不同样本、不同试剂时谨记及时更换吸头，封板胶纸只限一次性使用。

6.浓缩酶结合物及显色底物请避光保存，显色底物在添加之前，应保持无色，请勿使用已变为蓝色的显色底物。

7.严格按照说明书的操作进行，试验结果判定必须以酶标仪读数为准。

**样本收集、处理及保存方法:**

1.血清：室温血液自然凝固 30 分钟，离心 20 分钟（2000-3000 转/分）。仔细收集上清，若保存过程中出现沉淀，应再次离心，避免反复冻融。

2.血浆：根据样本的要求选择 EDTA 或柠檬酸作为抗凝剂，离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分）。仔细收集上清，若保存过程中出现沉淀，应再次离心。

3.细胞上清液：检测分泌性的成分时，用无菌管收集。离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分）。仔细收集上清。

4.若样本无法立即检测，请将其按最小使用量分装，-20℃—-70℃保存，避免反复冻融。尽量避免使用溶血或高血脂样本。如果血清中含有大量颗粒，检测前先离心或过滤去除；室温下解冻，请勿于 37℃或更高的温度加热解冻。

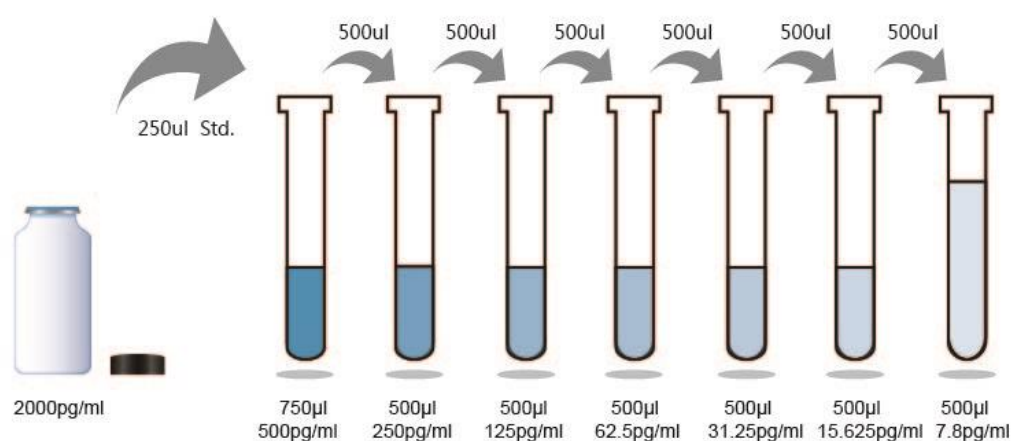
5.不能检测含  $\text{NaN}_3$  的样本，因  $\text{NaN}_3$  抑制辣根过氧化物酶的活性。

6.请根据实际情况，将样本做适当倍数稀释（建议根据预试验结果确定稀释倍数）。

注：血清或血浆样本建议至少做 1:2 稀释。

### 试剂准备：

- 1.试剂回温：请在实验前 30min 内，将试剂盒和待测样本置于室温下回温。
- 2.洗涤液配制：根据浓缩洗液的浓缩倍数，用双蒸水或去离子水进行相应倍数稀释后备用。
- 3.标准品梯度稀释：取 1ml 标准品/样本稀释液（S1）至冻干标准品中，静置 15 分钟待其完全溶解后轻轻混匀(浓度为 2000pg/ml)，然后取 7 只聚丙烯试管，第一只试管加入 750 $\mu$ l 标准品/样本稀释液（S1），其余各管加入 500 $\mu$ l 标准品/样本稀释液（S1），按照以下浓度进行 2 倍稀释：500、250、125、62.5、31.25、15.62、7.8 pg/ml 进行稀释。500pg/ml 为标准曲线最高点浓度，标准品/样本稀释液（S1）作为标准曲线的零点（0pg/ml）。复溶过的标准品原液（2000pg/ml）未用完的应废弃或根据需要按照一次用量分装，并将其贮存在-20~-80℃冰箱。



- 4.生物素化抗体工作液：根据每孔50 $\mu$ l的试验所需用量，用生物素化抗体稀释液（S2）将浓缩生物素化抗体（100 $\times$ ）稀释成1倍应用工作液，请于30min内使用。
- 5.酶结合物工作液：根据每孔100 $\mu$ l试验所需用量，用酶结合物稀释液（S3）将浓缩酶结合物（100 $\times$ ）稀释成1倍应用工作液，请于30min内使用。

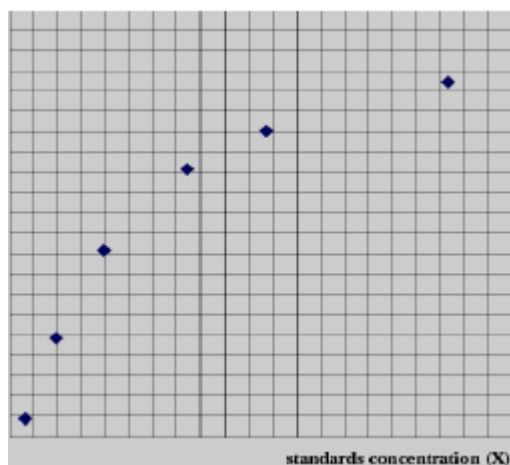
### 操作步骤：

- 1.加样：根据试验所需用量，取出相应抗体包被板条，并增加 1 孔作为空白对照孔，分别将已配制好的标准品、标准品零点（S1）及待测样本以 100 $\mu$ l/孔加入实验孔底部，尽量不触及孔壁，同时，各实验孔（空白对照孔除外）加入生物素化抗体工作液（50 $\mu$ l/孔），充分混匀。
- 2.孵育：用封板胶纸封板后置室温孵育 120min（空白对照孔除外）。充分混匀对反应结果尤为重要，要使用微量振荡器（最低频率 700rpm）。

- 3.洗涤：小心揭掉封板胶纸，弃去液体，甩干，每孔加满洗涤液（350 $\mu$ l），静置 30 秒后弃去，如此重复 4 次，最后于吸水纸上拍干。
- 4.加酶结合物工作液：各实验孔加入酶结合物应用工作液 100 $\mu$ l（空白对照孔除外）。
- 5.孵育：用封板胶纸封板后置室温孵育 30min（空白对照孔除外），要使用微量振荡器（最低频率 700rpm）。
- 6.洗涤：同上述洗涤过程（步骤 3），洗板 4 次。
- 7 显色：每孔加入 100 $\mu$ l 显色底物，避光，室温显色 10-20min。
- 8 终止：每孔加终止液 100 $\mu$ l，终止反应（此时蓝色立转黄色）。
- 9 测定：用酶标仪 450nm 波长测定各孔的吸光度（OD 值），测定应在加终止液后 5min 以内进行。

#### 结果判定：

- 1.每个标准品和样本的 OD 值减去空白孔的 OD 值，为最终数值，如果做复孔,求其平均值。
2. 使用计算机软件以吸光度 OD 值为纵坐标(Y),相应的 IFN- $\gamma$  标准品浓度为横坐标(X),生成相应的标准曲线,样本的 IFN- $\gamma$  含量可根据其 OD 值由标准曲线换算出相应的浓度。若样本 OD 值高于标准品曲线上限，请做适当倍数稀释，计算样本浓度时需乘以相应稀释倍数。



本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线为准

试剂盒性能:

批内与批间差均小于 10%

检测范围:

7.8pg/ml -500pg/ml

灵敏度:

3.9pg/ml

## 常见问题分析及解决办法

| 问题         | 可能原因               | 解决办法                                            |
|------------|--------------------|-------------------------------------------------|
| 无颜色        | 不同试剂盒或不同批号的试剂混合    | 重新检查试剂的标签，确准所有组分都属于正使用的试剂盒中的。不能混用不同试剂盒或不同批号的试剂。 |
|            | 漏加抗体、酶、显色剂         | 检查操作流程，注意不要漏加                                   |
|            | HRP 酶污染了叠氮钠        | 使用新配制的试剂，禁含叠氮钠                                  |
|            | 试剂配制/使用有误          | 重做试验，严格按说明书操作，每次配制和使用前看清标签                      |
| 显色弱        | 超过有效期的产品可能会产生很弱的信号 | 检查产品有效期                                         |
|            | 缩短孵育时间能使实验信号变弱     | 检查孵育时间                                          |
|            | 使用了被污染的试剂          | 检查试剂是否被污染                                       |
|            | 仪器设定不正确，滤光片不匹配     | 仪器是否设定正确，滤光片的使用等                                |
|            | 洗涤操作不规范            | 洗涤不充分，使用手工洗板常出现                                 |
|            |                    | 洗瓶洗涤，每孔应完全充满洗涤缓冲液，倾出时应迅速                        |
|            |                    | 若用洗板机，应校准并设定足够充满每孔的体积量。板内侧不应接触设备                |
|            |                    | 检查每孔是否有残留的洗液或每孔加样量的体积是否准确                       |
|            |                    | 可在两次洗板之间加 30 秒的浸泡                               |
| 高背景        | 实验中孵育温度和时间不适当      | 确定每一试验步骤的孵育温度和时间是否适当                            |
|            | 酶加量过多              | 加酶前验看移液器调节量是否准确                                 |
|            |                    | 检查稀释度，若必要进行效价测定                                 |
| 标曲佳但样本孔无信号 | 样本中靶标物含量低或样本中无靶标物  | 设置阳性对照，重复实验                                     |
|            | 样本基质效应影响检测         | 重新稀释样本后复测                                       |
| 标曲佳但样本信号偏高 | 样本中待检物含量超过标准曲线范围   | 重新稀释样本后复测                                       |