

ELISPOT Protocol

プレートにコート

1. ローエンドトキシン/アザイドフリー 無菌の未標識キャプチャー抗体 (BioLegendのLEAF™抗体が適しています。)を無菌コーティングバッファーで最終濃度0.5~4 μ g / mLに希釈し、高親和結合PVDFメンブレン (Millipor Cat.No. MAIPS-4510) ELISPOT用プレートに100 μ L / wellを加えます。
2. 4°Cの湿潤箱でオーバーナイトもしくは37°C湿潤で4時間以上置きます。

プレートのブロッキング

3. 無菌PBSを200 μ L / well加え3回繰り返し洗浄します。
4. 無菌ブロッキングバッファー200 μ L / wellを加えます。
5. プレートを密封し室温で1時間以上インキュベートします。
6. 無菌PBSを200 μ L / well加え3回繰り返し洗浄します。

培養の準備と抗原、マイトジェンの添加

7. 抗原もしくはマイトジェンを無菌培養液で至適濃度に希釈し、ELISPOTプレートに100 μ L / wellを加えます。
8. 細胞を無菌培養液で希釈し100 μ L / wellを加えます。細胞濃度は50,000~500,000 cells / wellにします。事前に必要な細胞数をご確認下さい。
9. プレートを密封し、37°C、5% CO²インキュベーターで最適な刺激条件まで培養します。IFN- γ 、IL-2、TNF- α は24時間、IL-4、IL-5、IL-10は48時間の培養を推奨します。

ディテクション抗体の添加

10. PBSを200 μ L / well加え3回繰り返し洗浄します。
11. PBS-Tweenを200 μ L / well加え3回繰り返し洗浄します。
12. PBS-Tween-BSAで0.25~2 μ g / mLに希釈したビオチン標識ディテクション抗体を100 μ L / well加えます。
13. プレートを密封し4°Cでオーバーナイトもしくは室温で2時間以上インキュベートします。

アビジンペルオキシダーゼ (Av-HRP) の添加

14. PBS-Tweenを200 μ L / well加え4回繰り返し洗浄します。
15. PBS-Tween-BSAで(通常1/500~1/2000倍)に希釈したAv-HRP (Cat.No.405103)もしくはその他の酵素標識アビジンを100 μ L / well加えます。
16. プレートを密封し室温で1~2時間以上インキュベートします。
17. PBS-Tweenを200 μ L / well加え3回繰り返し洗浄します。
18. PBSを200 μ L / well加え3回繰り返し洗浄します。

基質の添加

19. フレッシュな基質溶液を200 μ L / well加えます。
20. 室温でスポットの発色を確認してから、水道水で洗い流し廃液コンテナ上で強く叩いて反応を止めます。
21. 風を当てオーバーナイトで完全に乾かします。
22. 顕微鏡下でマニュアルもしくは自動イメージ解析機を用いてスポット数を計数します。プレートは3か月まで解析できます。

調製試薬

Note : 全てのバッファー、溶液にはアジ化ナトリウムは使用できません。アジ化ナトリウムはホースラディッシュペルオキシダーゼを不活化します。

Phosphate Buffered Saline (PBS):

80.0 g NaCl
14.4 g Na₂HPO₄
2.4 g KH₂PO₄
2.0 g KCl
Add ddH₂O up to 10 L; pH to 7.2 with HCl

Coating Buffer:

Can use either Sterile PBS or
Sterile Carbonate Buffer (per ELISA protocol)
8.4 g Na HCO₃
3.56 g Na₂CO₃
Add ddH₂O up to 1.0 L, pH to 9.5.

PBS-Tween:

0.05% Tween-20 in PBS
(500 µl Tween-20 in 1L PBS)

Blocking Buffer (PBS-BSA):

1% BSA in PBS
(10 g BSA-Fraction V in 1L PBS)

PBS-Tween-BSA:

1% BSA in PBS-Tween
(10 g BSA-Fraction V in 1L PBS-Tween)

Tissue Culture (TC) Medium:

As appropriate for cells being analyzed

AEC Solution:

100 mg AEC (3-amino-9-ethyl-carbazole) in 10 ml DMF
(N,N, Dimethylformamide)
Solution should be prepared in a glass tube in a fume hood.

AEC Buffer:

(0.1 M Acetate): 148 ml 0.2 M acetic acid (11.55 ml glacial acetic acid per liter of water) and 352 ml of 0.2 M sodium acetate (27.2 g per liter of water)
Bring up to 1L with water and adjust to pH 5.0 if required

Substrate Solution:

800 µl AEC solution in 24 ml AEC buffer
Filter with 0.45 µm filter and add 12 µl 30% H₂O₂
Use immediately

トミーデジタルバイオロジー株式会社

カスタマーサポート

〒110-0008東京都台東区池之端2-9-1

TEL : 03-5834-0843 Fax : 03-5815-0813

mail : Biolegend@digital-biology.co.jp