

APPLICATION NOTE

利用 SpectraMax ABS Plus 微孔板读板机和 SimpleStep ELISA 试剂盒定量白细胞介素 -8

Cathy Olsen | Sr. Applications Scientist | Molecular Devices

前言

THP-1 是人外周血的单核细胞系，最初来源于急性单核细胞性白血病患者，常被用来体外研究巨噬细胞功能。它通常属于悬浮细胞，当用 PMA 处理后可分化为贴壁生长的巨噬细胞。THP-1 能释放许多细胞因子，其中包括白细胞介素 -8(IL-8)，一种能被许多类型细胞分泌的、在调节急性炎症反应中发挥作用的细胞因子。

IL-8 与许多分析物一样可以在 96 孔板中被 ELISA 检测定量。通常 ELISA 实验需要耗费 4 个小时，而在 Abcam 的 SimpleStep ELISA 试剂盒帮助下实验时间可以缩短至 90 分钟，节约了近三分之二的的时间，并且无损实验的灵敏度和重复性 (图1)。这里我们介绍了如何使用 hIL-8 SimpleStep ELISA 试剂盒以及如何在 SpectraMax ABS Plus 微孔板读板机上使用 SoftMax Pro 软件预置的便捷程序来测定 IL-8 的含量。

材料

- hIL-8 SimpleStep ELISA 试剂盒 (Abcam cat. #ab214030)
- THP-1 人外周血单核细胞 (ATCC cat. #TIB-202)

- THP-1培养基
 - RPMI-1640培养基 (ATCC cat. #30-2001)
 - Benchmark胎牛血清 (Gemini cat. #100-106)
 - β-巯基乙醇 (Sigma cat. #M6250-100mL)
 - 青-链霉素 (10,000 U/mL) (ThermoFisher cat. #15140122)
- SpectraMax ABS Plus微孔板读板机 (Molecular Devices cat. #ABS Plus)

优点

- 利用 Abcam SimpleStep ELISA 试剂盒可将 ELISA 实验时间从 260 分钟减少到 90 分钟，无损实验的灵敏度和重复性
- 在 SpectraMax ABS Plus 微孔板读板机上，整块 ELISA 板的读板时间可减少到 5 秒
- SoftMax Pro 软件可自动计算样品浓度和绘制曲线

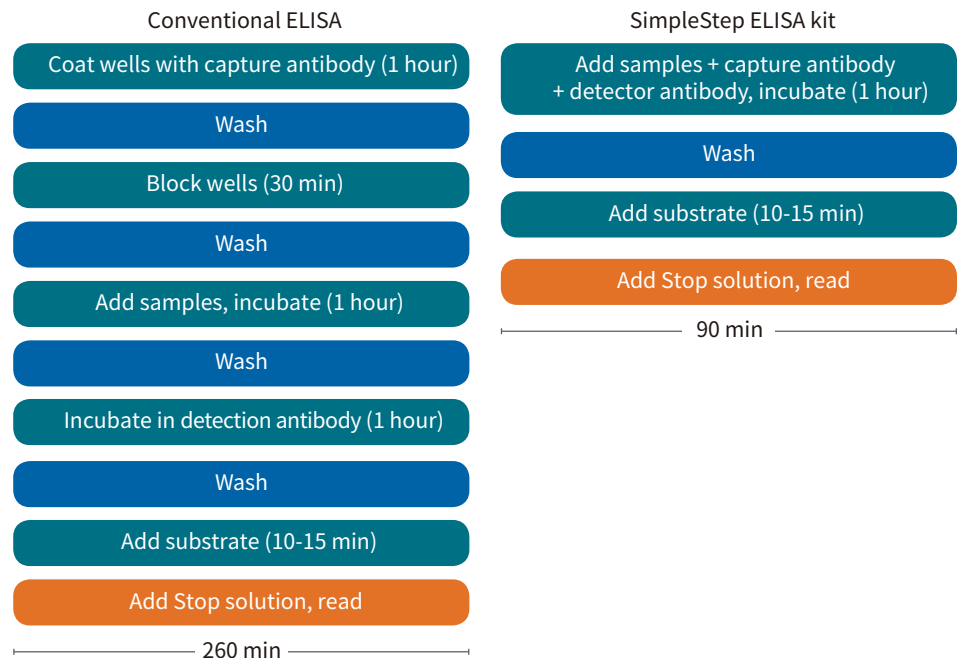


Figure 1. Comparison between SimpleStep ELISA kit and conventional ELISA workflows. Abcam's SimpleStep ELISA kit provides results in 90 minutes with its streamlined protocol. Unlike conventional ELISAs, the SimpleStep ELISA kit only requires one incubation and one wash step, reducing assay time by nearly two thirds.

方法

准备 THP-1 细胞

96 孔板每孔中预先加入 2 万个悬浮的未分化的 THP-1 细胞，随后用 2.5 ng/μL 的 PMA 或 DMSO（阴性对照）37°C 处理细胞 48 小时。处理时间结束后收集细胞上清 -80°C 冻存直至 ELISA 检测。

ELISA

ELISA 实验前需融化样品，2000 g 离心 10 分钟去除细胞碎片，上清液用试剂盒提供的稀释液按照 1:5, 1:10 以及 1:50 比例稀释。按照试剂盒说明书配制好标准品后，将样品与标准品加入试剂盒提供的微孔板中。然后每孔加入抗体混合物，孔板密封好后放入摇床室温震荡 1 小时。1 小时后用 Wash Buffer PT 洗涤每孔 3 遍，然后加入底物 TMB，暗室内置于摇床上震荡 15 分钟显色。15 分钟后加入终止液终止反应，并于 SpectraMax ABS Plus 微孔板读板机上测定 450nm 处吸光度。这一过程可在 SoftMax Pro 软件预置的便捷程序中实现（参见图 1 工作流程）。

结果

利用 SoftMax Pro 软件预置的“HRP and TMB”模板可以得到 IL-8 的线性标准曲线， R^2 达到 1000（图 2）。随后软件根据标准曲线可以获得 PMA 处理和阴性对照样品中 IL-8 的浓度。因稀释度不够而超出标准曲线线性范围的样品在结果列表中被标记为“R”（图 3）。图 4 结果显示了经软件计算后 PMA 处理后的细胞 IL-8 的含量为 3400 pg/mL，比用 DMSO 处理的阴性对照（63 pg/mL）高 55 倍。

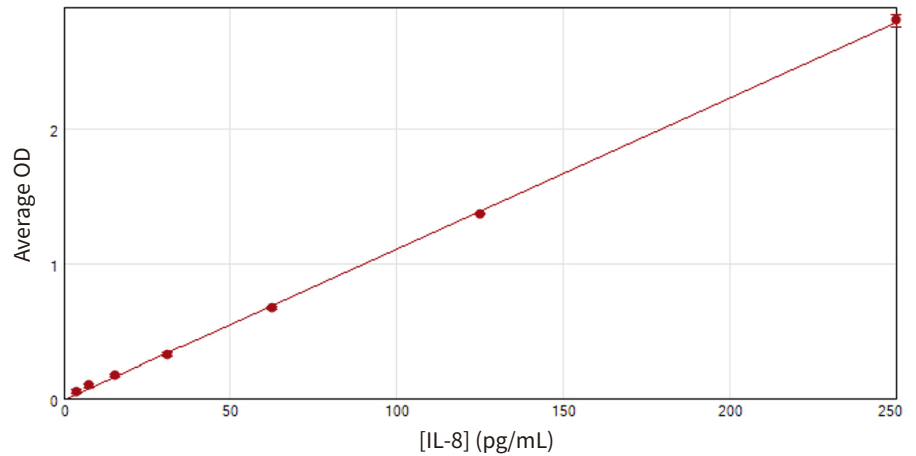


Figure 2. ELISA standard curve. The IL-8 standards were diluted in Sample Diluent and assayed using the Human IL-8 SimpleStep ELISA kit. A linear curve fit was applied to the standards in SoftMax Pro Software, and the generated standard curve demonstrated excellent linearity ($r^2 = 1.000$).

2.5ng/μL_PMA										
Sample	Well	DilutionFactor	R	OD	Result	Adj Concentration	MeanResult	Std.Dev.	CV%	
01	C4	5.000	R	3.864	346.196	17309.794	17309.794	0.000	0.000	
	C5		R	3.864	346.196	17309.794				
	C6		R	3.864	346.196	17309.794				
02	D4	10.000	R	3.766	337.485	16874.253	16334.926	536.960	3.287	
	D5		R	3.644	326.603	16330.161				
	D6		R	3.526	316.007	15800.364				
03	E4	50.000		0.788	71.380	3569.021	3440.220	149.428	4.344	
	E5			0.764	69.263	3463.151				
	E6			0.700	63.563	3178.151				
	F4			0.794	71.934	3596.717				
	F5			0.756	68.584	3429.201				
	F6			0.751	68.102	3405.079				

Figure 3. Group table displaying calculated sample concentrations. The IL-8 concentrations of PMA-treated cells were automatically interpolated from the standard curve by the preconfigured SoftMax Pro protocol and displayed in a group table. Any samples showing an ‘R’ in the ‘R’ column had a calculated concentration that is outside the range of the standard curve, in this case indicating the need to further dilute the sample.

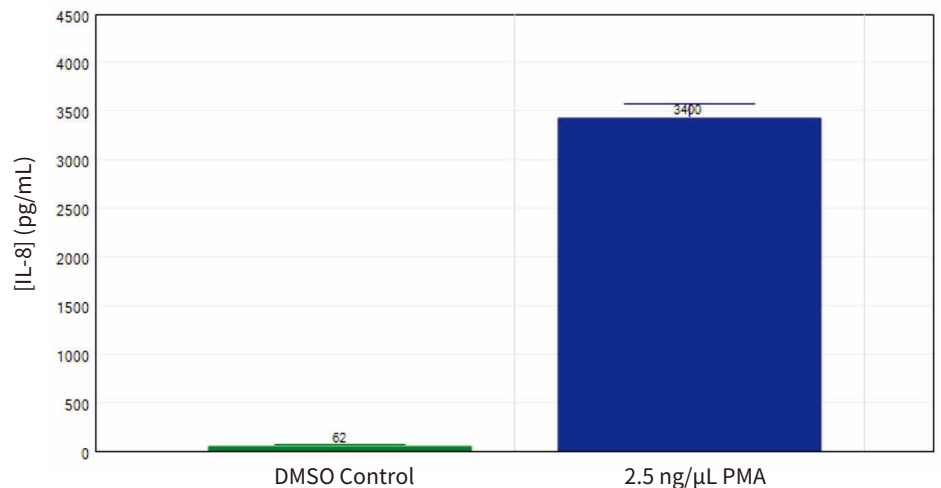


Figure 4. IL-8 concentrations measured in undifferentiated (DMSO control) and differentiated (2.5 ng/μL PMA) THP-1 cells. 2.5 ng/μL PMA-treated THP-1 cells produced 3400 pg/mL of IL-8 compared to the 62 pg/mL IL-8 produced by undifferentiated THP-1 cells, a 55-fold increase.

结论

SpectraMax ABS Plus 微孔板读板机和 Abcam hIL-8 SimpleStep ELISA 试剂盒提供了一种快速、灵敏的检测 IL-8 的方法。Abcam SimpleStep ELISA 试剂盒独有的抗体结合技术,使得从 THP-1 细胞上清中测定 IL-8 含量的时间可以缩短至 90 分钟,比传统 ELISA 方法节约了近三分之二的时 间,并且实验结果保持了原有的灵敏度和重复性。

SpectraMax ABS Plus 微孔板读板机所采用的8通道检测器能够极大地缩短用户获得实验数据的时间,其整块 96 孔 ELISA 板的读板时间仅为 5 秒。此外 SoftMax Pro 软件中预置的模板,还可以根据实验结果自动计算样品浓度和绘制标准曲线,并且能够将阴性对照曲线与实验结果曲线绘制在同一张图谱上加以比较,进一步减少用户分析实验数据的时间,帮助用户获得高质量、能发表的实验结果。



更多精彩内容
尽在官方微信

美谷分子仪器 (上海) 有限公司

全国咨询服务热线: 400-820-3586
上海 电话: 86-21-3372 1088
北京 电话: 86-10-6410 8669
成都 电话: 86-28-6558 8820
台北 电话: 886-2-2656 7585
香港

www.MolecularDevices.com.cn Email: info.china@moldev.com
传真: 86-21-3372 1066
传真: 86-10-6410 8601
传真: 86-28-6558 8831
传真: 886-2-2894 8267
传真: 852-2289 5385

地址: 上海市长宁区福泉北路 518 号 1 座 501 室 200335
地址: 北京市朝阳区广渠东路 3 号中水电国际大厦 612 & 613 室 100124
地址: 成都市锦江区东御街 18 号百扬大厦 2208 室 610016
地址: 台北市内湖区堤顶大道二段 89 号 3 楼
地址: 香港中环皇后大道中15号置地广场 公爵大厦21楼

