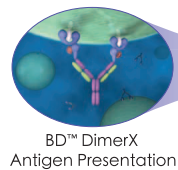
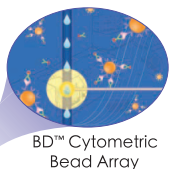
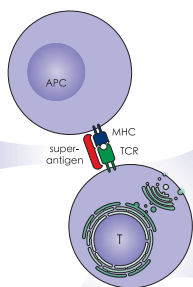


## 試驗方法二

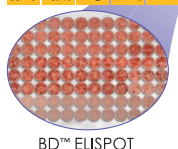


BD™ DimerX Antigen Presentation



BD™ Cytometric Bead Array

## 試驗方法一



BD™ ELISPOT

## 試驗方法三



BD™ In Vivo Capture Cytokine Assays

定量及定性抗原專一性 T 細胞免疫反應是研究疾病及評估疫苗效能最重要的課題。傳統的方法利用  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation 偵測 T 細胞增生及  $^{51}\text{Cr}$  release assays 偵測 T 細胞毒殺能力，不過這些方法對實驗室來說不僅耗時、費力而且結果也無法真正定量。

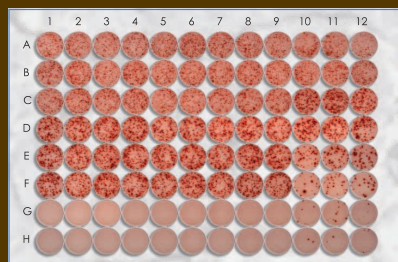
近年來，Enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay、Intracellular cytokine assay、MHC-peptide staining 等可以直接偵測、並且計數單一顆抗原專一性 T 細胞免疫反應的實驗技術紛紛取代傳統需利用 Isotope 的試驗方法。直接計數抗原專一性 T 細胞才能真正定量，同時也避免長時間體外再刺激導致 T 細胞再度增生或走向程序性死亡而誤判真正的 T 細胞免疫反應。其中 ELISPOT 和 Intracellular cytokine assays 可以得知抗原專一性 T 細胞在受到專一性抗原刺激時分泌 Cytokine 的能力，相較於 MHC-peptide staining 可

以測得對抗原 Peptide 有高親和力的 T 細胞，至於是否具有分泌 Cytokine 的能力就必須再進一步佐證。Cytometric Bead Array 則可同時定量分析多種 T 細胞所釋放的細胞激素並且減少血清、血漿或培養上清液檢體使用量。BD 公司提供一系列免疫功能試驗，不管實驗主題從哪個角度切入，都可以找到最符合需求的試驗方法。

## 試驗方法一 ELISPOT 免疫斑點分析 → 靈敏度最高

### ELISPOT 原理

ELISPOT 原理與 ELISA 相似，其全文為 Enzyme-linked Immunospot Assay。BD 公司的高專一性研發出 ELISPOT 檢測試劑是將經純化、且無毒性 NA / LE 等級抗體 (No sodium azide、Low endotoxin) 吸附在披覆 PVDF 膜的培養 96 微孔盤上。當培養在微孔盤中的細胞被活化後，這些被固定且具特異性的抗體，可以捕獲細胞局部產生的細胞激素。之後將細胞移除，被捕獲的細胞激素可進一步使用 Biotin 標記的二次抗體來標誌，其後再以結合酵素 Avidin-HRP 互相作用，並加入酵素受質 AEC 使其呈色，有反應作用的細胞會產生 10-20  $\mu\text{m}$  大小染色的斑點。最後使用傳統方法以顯微鏡進行人工判讀，或高效能之影像分析系統 (ELISPOT Plate Reader) 進行判讀，以計算細胞在被刺激後產生細胞激素的百分比，可提供治療或病理參考，現已廣泛運用於各項研究領域。



Detection of IFN- $\gamma$ -secreting cells by BD ELISPOT Human IFN- $\gamma$  Kit (Cat. No. 552138). Human PBMCs were stimulated with PMA and ionomycin for 18 hours. (blank controls: G 1-9: cells without stimuli; H 1-9: stimuli without cells)

### 應用

- 移植研究
- 疫苗開發
- Th0/Th1/Th2 細胞轉換分析
- 自體免疫研究
- 癌症研究
- 傳染疾病研究
- 抗原決定位定圖
- 過敏機制探討
- 體液免疫力研究

### 特點

- 最靈敏-可偵測到 30 萬分之一正在分泌 cytokine 的細胞
- 不挑剔-新鮮或解凍的細胞都可以
- 最新鮮-相較於 ELISA, ELISPOT 偵測剛剛從細胞正要分泌出來的細胞激素
- 很環保-刺激過後的細胞還可以再利用

購買 Antibody Pair  
可以半價加購 551951

購買 Set  
贈送 551951 一組

購買 Kit  
優惠價 9 折

特惠活動至  
3月31日止

**1 Capture Antibody**

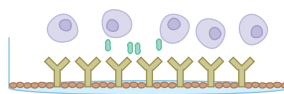
For Sets and Pairs: Coat microwells with anti-cytokine capture antibody.  
For Kits: Go to Step 3; Steps 1 and 2 not necessary.

**2 Blocking**

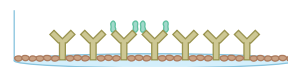
Block unoccupied sites with protein

**3 Add Cells**

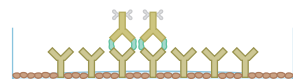
Incubate cells in well with Ag/stimulus etc.

**4 Wash**

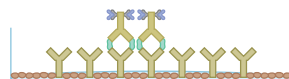
Cells are washed off

**5 Detection Antibody**

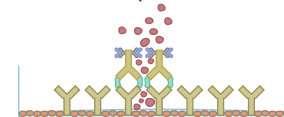
Add Biotinylated anti-cytokine detection antibody

**6 Enzyme-Avidin**

Add Avidin-HRP

**7 Develop With Substrate**

Add substrate and monitor formation of colored spots

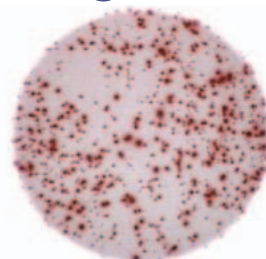


## BD 的好 比較就知道！！

**BD ELISPOT**  
可以得到清晰的點關鍵就是

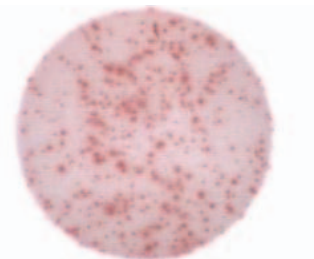


**Capture antibody**  
嚴選高專一性 NA / LE 無毒抗體  
(no azide / low endotoxin format :  
不含 sodium azide、內毒素 endotoxin)



Panel A

他牌



Panel B

BD Biosciences Pharmingen 的 ELISPOT 試劑採用高專一性 (NA / LE) 無毒抗體，同樣的人體 PBMC 樣品，在通過完全相同的實驗，呈現較清晰的小色點 (Panel A)。

### ELISPOT 包裝

Component	Antibody Pair	Set	Kit
BD ELISPOT plates	未附加	10 uncoated	2 Antibody-coated and blocked
Capture antibody	For 5 plates	For 10 plates	Pre-coated on plates
Detector antibody (biotin-conjugated)	For 5 plates	For 10 plates	For 2 plates
Streptavidin-HRP	需另外購買，貨號：557630	For 10 plates	For 2 plates
AEC chromogen	需另外購買，貨號：551951	需另外購買，貨號：551951	For 2 plates
Wash concentrate, PBS concentrate, assay diluent	未附加	未附加	For 2 plates

\* ELISPOT plates 建議搭配 Millipore MSIPS4510 ( MultiScreenHTS-IP Filter Plate ) for ELISPOT Assay

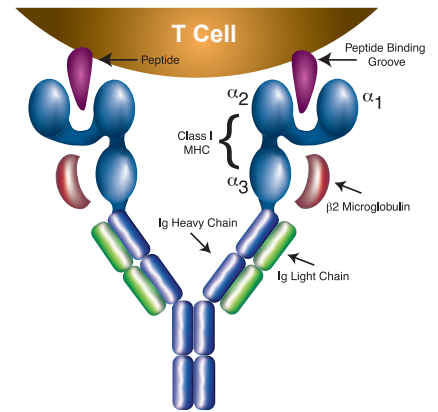
### 訂購資訊

Description	Size	Cat. No.	Description	Size	Cat. No.
Human IL-2 ELISPOT Pair	5 plates	551884	Mouse IL-2 ELISPOT Pair	5 plates	551876
Human IL-2 ELISPOT Set	10 plates	551282	Mouse IL-2 ELISPOT Set	10 plates	551076
Human IL-4 ELISPOT Pair	5 plates	551885	Mouse IL-4 ELISPOT Pair	5 plates	551878
Human IL-4 ELISPOT Set	10 plates	551084	Mouse IL-4 ELISPOT Set	10 plates	551017
Human IL-5 ELISPOT Pair	5 plates	551886	Mouse IL-5 ELISPOT Pair	5 plates	551880
Human IL-5 ELISPOT Set	10 plates	551085	Mouse IL-5 ELISPOT Set	10 plates	551075
Human IL-10 ELISPOT Pair	5 plates	551883	Mouse IL-6 ELISPOT Set	10 plates	552567
Human IL-10 ELISPOT Set	10 plates	551018	Mouse IL-10 ELISPOT Pair	5 plates	557982
Human IL-12p70 ELISPOT Set	10 plates	552574	Mouse IFN- $\gamma$ ELISPOT Pair	5 plates	551881
Human IFN- $\gamma$ ELISPOT Pair	5 plates	551873	Mouse IFN- $\gamma$ ELISPOT Set	10 plates	551083
Human IFN- $\gamma$ ELISPOT Set	10 plates	551849	Mouse IFN- $\gamma$ ELISPOT Kit	2 plates	552569
Human IFN- $\gamma$ ELISPOT Kit	2 plates	552138	Mouse TNF ELISPOT Pair	5 plates	551875
Human TNF ELISPOT Pair	5 plates	551882	Mouse TNF ELISPOT Set	10 plates	551491
Human TNF ELISPOT Set	10 plates	551446	Rat IFN- $\gamma$ ELISPOT Set	10 plates	557819
Human Granzyme B ELISPOT Set	10 plates	552572			

## 試驗方法二 DimerX I → 不需固定、打洞

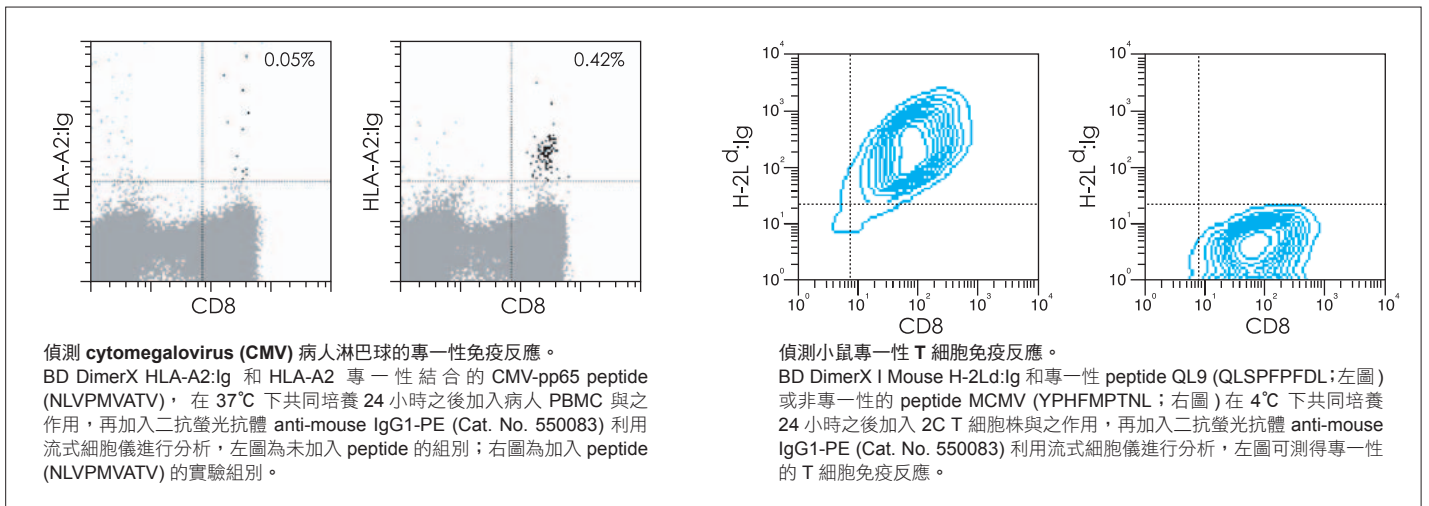
### Recombinant Soluble Dimeric Proteins (MHC-Ig 雙聚體重組蛋白)

BD DimerX 為 MHC 及抗體的融合蛋白，為利用 DNA 重組技術將 MHC class I 三個胞外結構部位 ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ) 和 mouse IgG1 免疫球蛋白的 Variable Heavy (VH) 變異區重鏈的 N 端融合連接組成。含此融合蛋白 DNA 的表現載體和含有人類  $\beta 2$ -microglobulin DNA 的表現載體一起轉植進無法表現免疫球蛋白重鏈而只會表達免疫球蛋白輕鏈 ( $\lambda$ ) 的骨髓瘤細胞株 (myeloma cell line)，而表達出來的分泌型蛋白質即包含重組的 MHC-Ig 融合蛋白重鏈、及利用雙硫鍵連接重組重鏈的輕鏈、及非共價鍵結的人類  $\beta 2$ -microglobulin 的雙聚體重組蛋白質。DimerX 含有兩個 MHC 抗原結合部位可提高和抗原專一性 T 細胞的親和力以穩定結合。



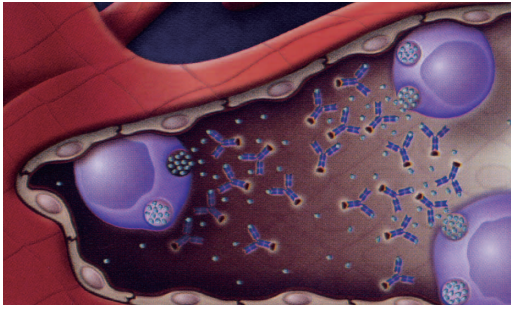
#### BD DimerX 優點

操作簡單	將抗原 peptide 和 DimerX 一起作用進行結合，再利用 peptide-loaded DimerX 和抗原專一性 T 細胞作用，加入螢光二抗即可上流式細胞儀進行分析抗原專一性 T 細胞百分比。
靈活搭配	可搭配細胞表面抗體例如：CD44, CD62L, CCR7 或細胞內 Cytokine 抗體進行多色螢光流式細胞技術，以監控抗原專一性 T 細胞的頻率、分布及轉變成記憶型 T 細胞的動態。( 需注意：DimerX isotype 為 mouse IgG1 請避免其他抗體 Isotype 也為 mouse IgG1 而造成干擾。)
彈性運用	DimerX 可以輕鬆搭載抗原 peptide 的特性，不僅可以偵測抗原專一性 T 細胞，更可以進行 T 細胞抗原決定位的搜尋 (T-cell epitope mapping)。
結構穩定	DimerX 的生產來源非經由細菌進行蛋白質變性及再復性，所以蛋白質分子組成很穩定。
專一性高	不同於細胞內 Cytokine 流式細胞技術和 ELISPOT，BD dimerX 可以進一步偵測因 TCR 辨識到專一性 MHC-peptide 結構而引發的免疫反應。



#### 訂購資訊

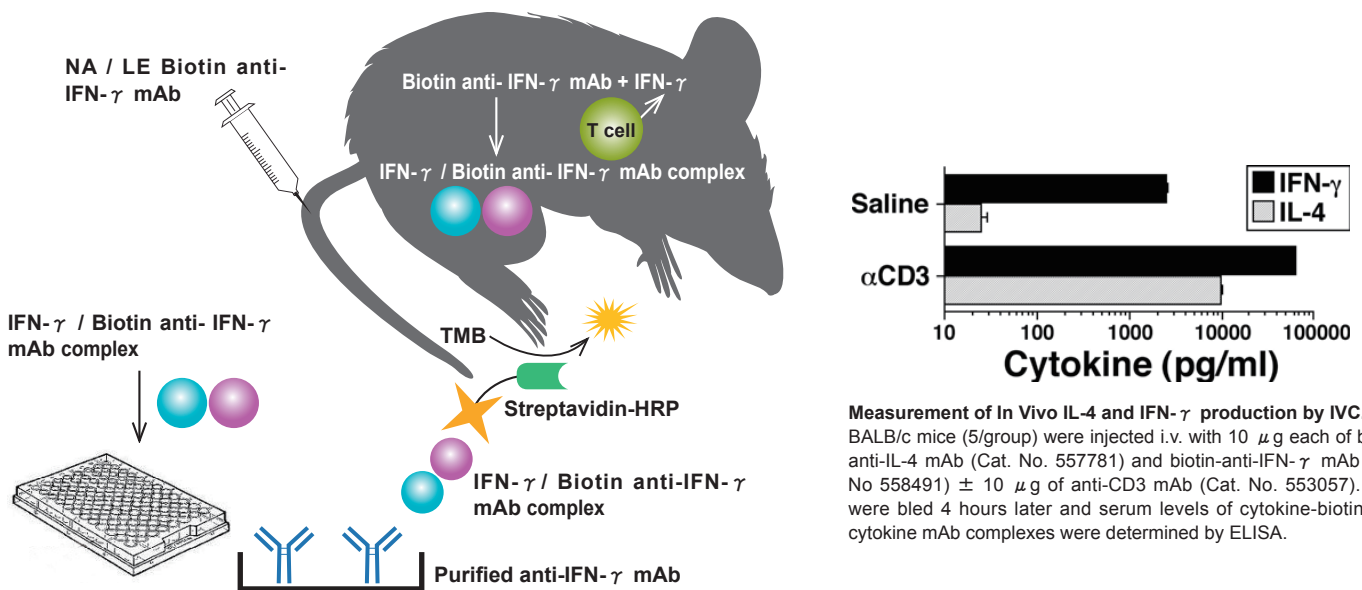
DESCRIPTION	REACTIVITY	ISOTYPE	SIZE	CAT. NO.
BD DimerX I Soluble Dimeric Human HLA-A2:Ig Fusion Protein	Hu	Ms IgG1, $\lambda$	0.05mg	551263
BD DimerX I Soluble Dimeric Human CD1d:Ig Fusion Protein	Hu	Ms IgG1, $\lambda$	0.1mg	557764
BD DimerX I Soluble Dimeric Mouse H-2Kb:Ig Fusion Protein	Ms	Ms IgG1, $\lambda$	0.25mg	557599
BD DimerX I Soluble Dimeric Mouse H-2Ld:Ig Fusion Protein	Ms	Ms IgG1, $\lambda$	0.25mg	550751
BD DimerX I Soluble Dimeric Mouse H-2Db:Ig Fusion Protein	Ms	Ms IgG1, $\lambda$	0.25mg	551323
BD DimerX I Soluble Dimeric Mouse CD1d:Ig Fusion Protein	Ms	Ms IgG1, $\lambda$	0.25mg	557599
Anti-Mouse IgG1	Ms	Rat IgG2a, $\lambda$	0.1mg	550083
Human $\beta 2$ Microglobulin	Hu		0.1mg	551089



### 細胞激素體內偵測試劑

免疫反應最直接的證據是分泌細胞激素 Cytokine，然而很多細胞激素，例如：IL-4 在生物體內的半衰期很短，快速的被製造、利用、及代謝掉，以至於在血清中無法累積至傳統 ELISA 可以偵測的量。免疫細胞體外再刺激而製造的細胞激素可以有足夠的量進行 ELISA 或 CBA 分析，但是體外再刺激分泌的細胞激素，是否可以完整的反應體內細胞激素分泌的情形，無法得知！並且需要犧牲老鼠以取得免疫細胞，如果需不同時間點的結果則有更多組別的老鼠需犧牲掉。

美國辛辛那提醫學中心 Finkelman 和 Morris 研究團隊發現利用中和性的單株抗體去抓取細胞激素，可以增加細胞激素在生物體內的半衰期，生物體內累積足夠量的 Cytokine / anti-cytokine mAb complex 則可以利用 ELISA 進行分析，不僅可以解決微量細胞激素無法分析的問題、避免犧牲老鼠、更可以真實反應在生物體內分泌的情況，此種分析方法則被稱為辛辛那提細胞激素獲取試驗 Cincinnati cytokine capture assay (CCCA)，BD 公司 *In vivo* capture cytokine assays 則是以 CCCA 為原理而研發的高靈敏度體內細胞激素分析試驗。



### *In vivo* capture cytokine assays 優點

高靈敏度	靈敏度高於傳統 ELISA 50-100 倍
體內監測	真實呈現生物體內細胞激素分泌情況，微量細胞激素適用，且不影响細胞激素所誘發的免疫反應。
操作簡單	注射 10 $\mu$ g NA/LE Biotin anti- IFN- $\gamma$ mAb 進老鼠體內 2-72 小時之後收集血清、即可利用 ELISA 分析細胞激素濃度。
動態觀察	只需 50 $\mu$ l 血清不需犧牲老鼠，可分析不同時間點細胞激素並且觀察後續生理免疫反應，以減少實驗老鼠的數量。

### 訂購資訊

Description	Size	Cat. No.
IFN- $\gamma$ , Mouse In Vivo Capture Assay	10 plates	558491
TNF, Mouse In Vivo Capture Assay	10 plates	558568
IL-10, Mouse In Vivo Capture Assay	10 plates	558072
IL-6, Mouse In Vivo Capture Assay	10 plates	558075
IL-4, Mouse In Vivo Capture Assay	10 plates	557781
IL-2, Mouse In Vivo Capture Assay	10 plates	557937

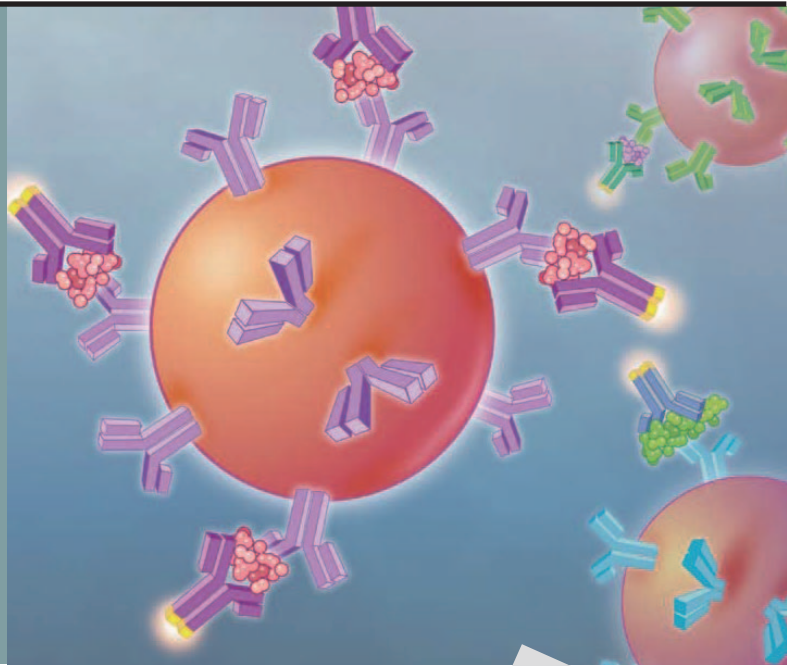
Assay Components :

- *In Vivo* Capture monoclonal antibody (biotinylated, BD NA/LE™)
- Recombinant cytokine standard
- Streptavidin-HRP
- Purified capture monoclonal antibody for plate coating



**NEW**  
新品上市

# 史上最強 Femtogram 等級的 Cytokine 偵測試劑



## Enhanced Sensitivity 靈敏度最強

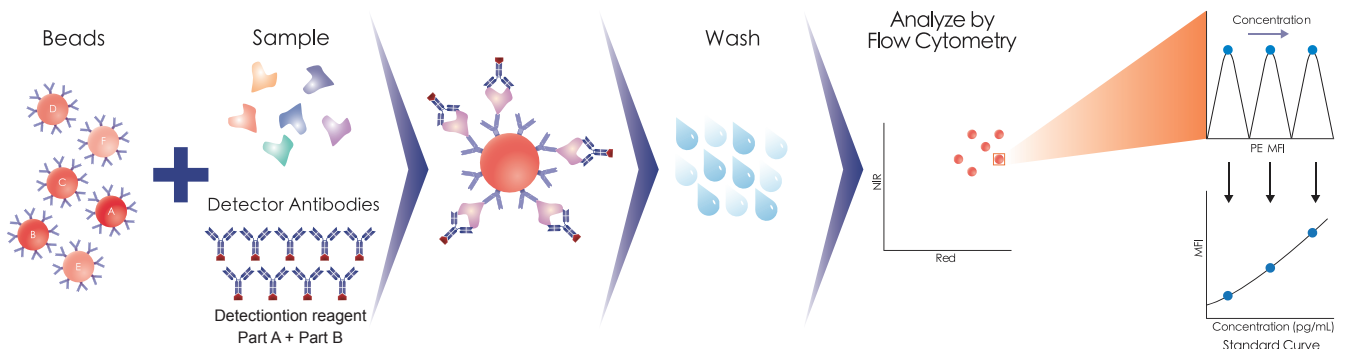
在多重蛋白的偵測技術上，BD Cytometry Beads Array (CBA) 已經成功地幫助研究學者節省實驗所需時間、節省多重蛋白偵測所需的經費、並且加速實驗的進展；今年，BD 推出更高靈敏度的 BD™ CBA Enhanced Sensitivity Flex Set System，在大部分以微珠為基礎的偵測方法尚停留在 5-10 pg/ml 靈敏度的時候，BD CBA Enhanced Sensitivity Flex Set System 已經可以偵測到 274 fg/ml 的靈敏度，是目前大部分多重微珠偵測方法的 35 倍效能改善。這個創新得以讓研究學者在傳統方法無法偵測的樣本中，偵測微量蛋白質濃度變化，例如，培養初期的上清液，或是疾病初期的血清樣本。BD™ CBA Enhanced Sensitivity Flex Set System 提供十種細胞分化及發炎反應相關因子的偵測。

1. 定量範圍 **274 to 200,000 fg/mL**
2. 多參數分析，單一檢體可得到多種定量結果
3. 彈性組合、任意搭配完全符合實驗需求
4. 最多可同時分析 **10 種 Cytokine**，只需 **25~50 μL** 檢體量
5. 適用任何搭載 **488nm** 和 **633nm** 雷射光源的流式細胞儀

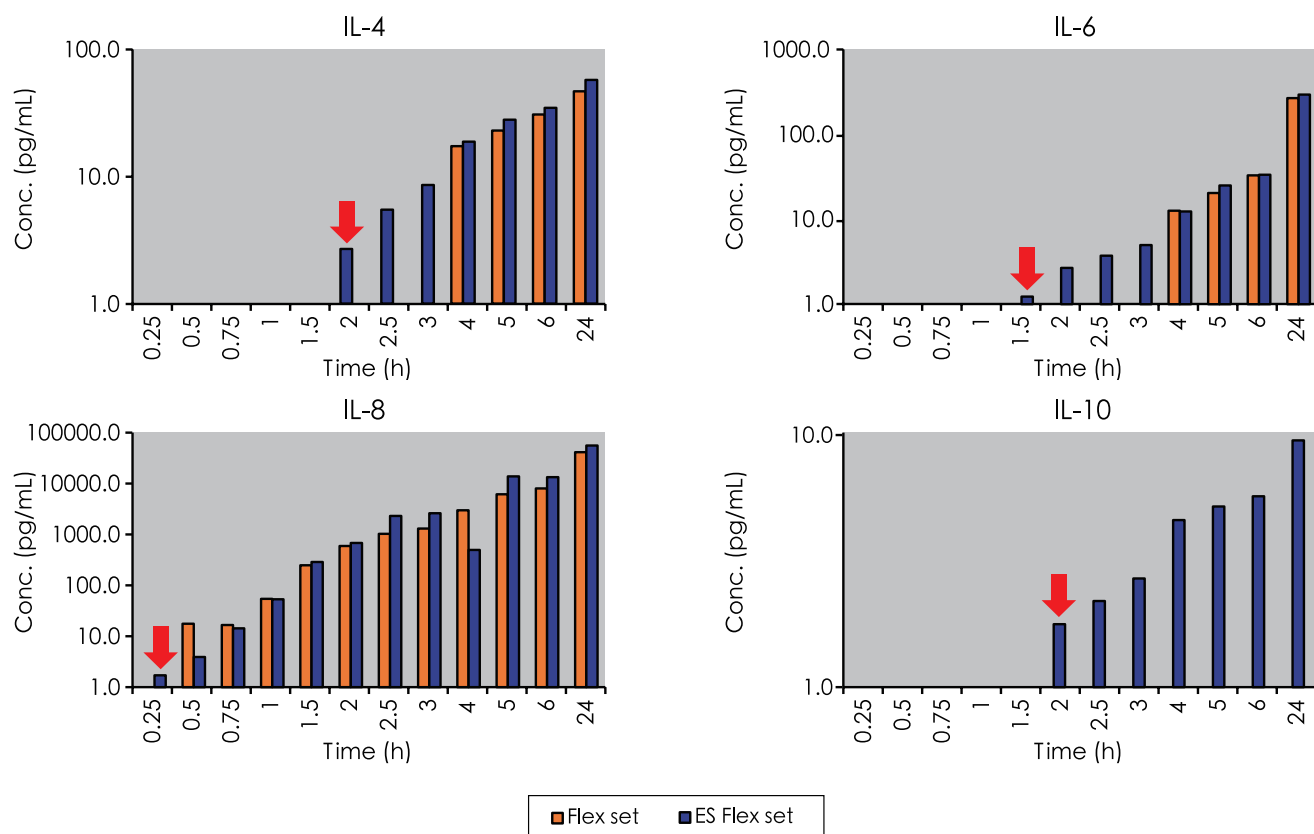
一定要親自體驗

## CBA Enhanced Sensitivity Flex Set 原理

BD CBA Enhanced Sensitivity Flex Set 作用原理與傳統 CBA 一樣，為結合微球免疫分析技術和流式細胞儀進行 Cytokine 分析。利用一系列微球，微球上各自包覆不同抗體 (Capture antibody)，同樣大小不同螢光強度的微球作為搭載不同細胞激素的象徵，搭配 PE 標記檢測抗體 (Detection antibody)，由 PE 螢光數值的變化，可以計算出樣本內特定細胞激素的含量，為了達到超強的靈敏度 BD 專利研發 Detection Reagent (Part A) 及 Enhanced Sensitivity Detection Reagent (Part B) 以偵測檢體中微量的 Cytokine，同樣的利用單一檢體可以獲得多參數分析，樣本可來自血清、血漿、組織培養上清液。



## Time course of human PBMCs stimulated with PMA and Calcium Ionophore.



	Enhanced Sensitivity CBA Flex Set	CBA Flex Set	ELISA
靈敏度	274 fg/ml	5-10 pg/ml	與 CBA 相同
單次分析因子數	自選，最多 10 種	自選，最多 30 種	1 種
反應作用時間	5 小時	3 小時	3.3 小時
需清洗步驟次數	兩次	一次	七次
檢體偵測重複	不需重複	不需重複	需三重複
檢體量	25-50 $\mu$ l	25-50 $\mu$ l	100 $\mu$ l
檢體分析形式	單管或 96 孔盤	單管或 96 孔盤	96 孔盤
分析儀器	具備雙雷射光源的流式細胞儀	具備雙雷射光源的流式細胞儀	酵素免疫分析讀取儀

### 訂購資訊

Description	SIZE	Cat. No.
Human IFN- $\gamma$ Enhanced Sensitivity Flex Set (Bead B8)	100 Tests	561515
Human IL-1 $\beta$ Enhanced Sensitivity Flex Set (Bead B4)	100 Tests	561509
Human IL-2 Enhanced Sensitivity Flex Set (Bead A4)	100 Tests	561517
Human IL-4 Enhanced Sensitivity Flex Set (Bead A5)	100 Tests	561510
Human IL-5 Enhanced Sensitivity Flex Set (Bead A6)	100 Tests	561511
Human IL-6 Enhanced Sensitivity Flex Set (Bead A7)	100 Tests	561512
Human IL-8 Enhanced Sensitivity Flex Set (Bead A9)	100 Tests	561513
Human IL-10 Enhanced Sensitivity Flex Set (Bead B7)	100 Tests	561514
Human IL-12 p70 Enhanced Sensitivity Flex Set (Bead C6)	100 Tests	561518
Human TNF Enhanced Sensitivity Flex Set (Bead C4)	100 Tests	561516
Human Enhanced Sensitivity Master Buffer Kit	100 Tests	561521
Human Enhanced Sensitivity Master Buffer Kit	500 Tests	561523