

Mouse IgG ELISA Kit

产品编号: EK0101

规格: 96T

检测范围: 100ng/ml→1.56ng/ml

敏感性: <10ng/ml

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: 用于体外定量分析小鼠血清、血浆。

工作原理

博士德所提供的小鼠 IgG 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)。预先包被的抗体为多克隆抗体。检测相抗体为多克隆抗体, 经 HRP 标记。样品加入酶标板孔反应后, PBS 或 TBS 洗涤。随后加入 HRP 标记抗小鼠 IgG 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小鼠 IgG 呈正相关。

试剂盒中内容 (96 孔)

1. 小鼠 IgG 冻干标准品, 1ug/管, 总 2 管。
2. 预包被抗小鼠 IgG 抗体的 96 孔板。
3. 样品稀释液, 30ml。
4. HRP 标记抗小鼠 IgG, 100ul, 效价 1: 100。
5. ABC 稀释液, 12ml。
6. TMB 显色液, 10ml。
7. 终止液, 10ml。
8. 洗涤缓冲液(25X), 20ml。
9. 封板膜, 4 张。

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。

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；将推荐的 PBS 或 TBS 洗涤缓冲液至少 0.3ml 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，凝固 2 小时后离心 $2000 \times g$ 20 分钟，收集血清。立即分析或分装后 -20°C 冷冻保存。

血浆——采用肝素或 EDTA 抗凝，抽血后 30 分钟内离心 $2000 \times g$ 20 分钟。立即分析或分装后 -20°C 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 $1-10\mu\text{g/ml}$ 。按 1: 100 稀释。297 μl 样品稀释液加 3 μl 样品。

中——指待测因子在 $100-1000\text{ng/ml}$ 。按 1: 10 稀释。225 μl 样品稀释液加 25 μl 样品。

低——指待测因子在 $1.56-100\text{ng/ml}$ 。按 1: 2 稀释。120 μl 样品稀释液加 120 μl 样品。

特低——指待测因子 $\leq 1.56\text{ng/ml}$ 。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. 小鼠 IgG 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 1 μg ，每次使用 1 管。

1. 配制 1 $\mu\text{g/ml}$ 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，然后反复颠倒/搓动以助溶解。
2. 配制 100 ng/ml 标准品：取 0.1ml 1000 ng/ml 的标准品加入有 0.9ml 样品稀释液的 Eppendorf 管中，混匀，做上标记。

3. 配制 50ng/ml→1.56ng/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 50ng/ml, 25ng/ml, 12.5ng/ml, 6.25ng/ml, 3.12ng/ml, 1.56ng/ml。取 0.3ml 100ng/ml 的标准品加入标记 50ng/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，直到最后一支样品管。
注意：已经稀释的标准品（1 μ g/ml），应在 12 小时内使用。-20℃冷冻保存条件下，2 天内可以使用，但不得反复冻融。

B. HRP 标记抗小鼠 IgG 抗体工作液：在使用前 2 小时内准备。

1. 根据每孔需要 0.1ml 计算总的用量（实际配制时应多配制 0.1-0.2ml）。
2. 按 1 μ l HRP 标记抗小鼠 IgG 加 ABC 稀释液 99 μ l 的比例配制工作液。轻轻混匀。

操作程序

已稀释好的 HRP 标记抗小鼠 IgG 和 TMB 显色液在加入酶标板孔前都应预先在 37℃ 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 $\times 2$ 。其余重包装好放入冰箱中。
2. 将 100ng/ml, 50ng/ml, 25ng/ml, 12.5ng/ml, 6.25ng/ml, 3.12ng/ml, 1.56ng/ml 的标准品各 0.1ml 依次加入一排 7 孔中，1 孔只加样品稀释液的作为零孔。对于血清、血浆，每孔加 100 μ l 已用样品稀释液稀释的样品。
3. 酶标板加封板膜，37℃ 反应 60 分钟。
4. 1X 洗涤缓冲液洗涤 3 次，每次浸泡 1 分钟左右。
5. 将准备好的 HRP 标记抗小鼠 IgG 工作液按每孔 0.1ml 依次加入（TMB 空白显色孔除外）。37℃ 反应 30 分钟。
6. 1X 洗涤缓冲液洗涤 5 次，每次浸泡 1-2 分钟左右。
7. 按每孔依次加入 90 μ l TMB 显色液，37℃ 避光反应 15-20 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）。
8. 按每孔 0.1ml 依次加入终止液，此时蓝色立转黄色。
9. 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。
10. 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。
请记住由于样品稀释了 N 倍，其实际浓度应该 $\times N$ 。



操作程序总结:

1. 加样品和标准品, 37℃反应 60 分钟。0.01M TBS 洗涤 3 次。
2. 加 HRP 标记抗小鼠 IgG, 37℃反应 30 分钟。0.01M TBS 洗涤 5 次。
3. TMB37℃反应 15-20 分钟。
4. 加入终止液, 读数。

典型数据

TMB37℃反应 15 分钟。

(数据供参考, 不同用户最佳显色时间会有所不同)

浓度	0.0ng/ml	1.56ng/ml	3.12ng/ml	6.25ng/ml	12.5ng/ml	25ng/ml	50ng/ml	100ng/ml
O.D.	0.055	0.269	0.433	0.736	1.159	1.599	1.960	2.111