

本试剂盒仅供研究使用, 不可用于诊断!

Research use only, not for diagnostic use!

兔IgG ELISA 检测试剂盒使用手册

IgG (Rabbit) ELISA Kit User Manual

Catalog No.	RGRB703-2
储存/Store at	2~8°C, 标准品保存于-20°C, 避光
灵敏度/Sensitivity	19.5 pg/mL
测定范围/Range	39-2500 pg/mL



注意: 使用前请阅读安全数据表(SDS) 并按照指示, 穿戴实验服、防护眼镜和手套操作!

产品描述

本产品为兔IgG酶联免疫吸附定量检测试剂盒。

IgG介绍

人和小鼠体内有五类免疫球蛋白：IgA、IgD、IgE、IgM 和IgG。目前已在兔子体内鉴定出四种类型：IgA、IgE、IgG 和 IgM。IgG 是最丰富的免疫球蛋白，分布在血液和组织中。免疫球蛋白由四条多肽链组成，两条相同的重链和两条相同的轻链通过二硫键连接在一起，形成四聚体结构。IgG 的分子量约为 150 kDa，与人和小鼠的 IgG 不同，兔 IgG 没有亚型。IgG 是体内最主要的抗体，具有抗病毒、中和病毒、抗菌及免疫调节的功能。它可以结合许多病原体，并在抗体依赖性细胞介导的细胞毒性中发挥重要作用。通常兔血清和血浆样本中含有约 5~10mg/ml 的 IgG。兔对外源蛋白质能产生强烈地免疫反应，兔免疫系统已被证明是开发抗体的优势系统，兔抗体对许多分子具有更高的亲和力和更多样化的识别，包括磷酸肽、碳水化合物和在小鼠中不具有免疫原性的免疫原。近年来，兔单克隆抗体技术日趋完善，兔单克隆抗体广泛用于生命科学研究的各个领域，在单抗药物开发中具有广阔前景。

试剂盒原理

本试剂盒采用夹心法酶联免疫分析技术。



图1. 预包被IgG抗体微孔板
孔板上预包被了抗兔IgG特异性抗体。

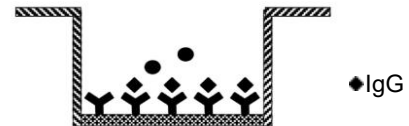


图2. IgG被抗体捕获
样品或标准品中的兔IgG与包被在微孔中的抗体结合。



图3. 加入生物素化IgG检测抗体

加入生物素偶联的抗兔IgG抗体，该抗体与第一抗体捕获的兔IgG结合。



图4. 加入链霉亲和素-HRP

孵育后，洗去未结合的生物素偶联的抗兔IgG抗体。加入链霉亲和素-HRP。

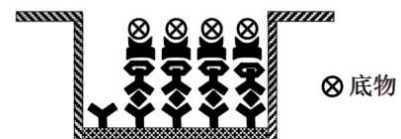


图5. 催化底物形成有颜色产物

加入底物，经过HRP催化形成有色产物，产物吸光值与样品或标准品中存在的兔IgG的量成比例。通过加入酸终止反应，并在450 nm处测量吸光值

试剂

兔IgG ELISA试剂盒(96次检测)

- 预包被抗兔IgG单克隆抗体的微孔板(12条, 每条8个孔) × 1块
- 冻干兔IgG标准品(5ng) × 2管
- 30×生物素偶联抗兔IgG检测抗体 × 1管
- 30×链霉亲和素-HRP × 1管
- 1×标准品&样本通用稀释液 (20mL) × 1瓶
- 1×生物素化抗体稀释液 (16mL) × 1瓶
- 1×链霉亲和素-HRP稀释液 (16mL) × 1瓶
- 20×清洗缓冲液(50mL) × 1瓶
- 1×TMB底物 (12mL) × 1瓶
- 1×终止液 (12mL) × 1瓶
- 封板膜 × 6张

试剂盒贮存

- 将试剂盒试剂储存在2至8℃之间, 将冻干标准品储存在-20℃以下。
- 使用后, 剩余试剂应立即放回冰箱。
- 请在标签上注明的试剂盒和试剂的有效期内使用。试剂盒只有在正确储存条件下, 才能保证试剂盒成分的有效期。
- 重复使用时避免试剂之间交叉污染。试剂间的污染会造成试剂盒失效。

适用样本与样本处理

- 该试剂盒适用于细胞培养上清、血清、血浆等样本的分析。分析其他生物样品时需对分析方法进行优化。
- 对于血液样本, 应当尽快将血清或血浆分离。样品中出现沉淀时, 需先将沉淀分离后再行分析。避免使用严重溶血或血脂异常的样本。
- 大量的样本应先分装后, 置于-20℃下冷冻保存, 以避免兔IgG的活性损失。如果样品在24小时内分析, 可先储存在2~8℃。样品应避免反复冻融。冷冻样品分析前, 应缓慢升至室温, 并轻轻混合。禁止在37℃的水浴中解冻样品。请勿涡旋或剧烈搅动样品。

需准备的材料

- 刻度移液管(5毫升和10毫升)
- 5μL至1000μL可调单通道微量移液器
- 50μL至300μL可调多通道微量移液器
- 一次性吸头
- 一次性样品槽

- 配制试剂所需的烧杯、烧瓶、量筒等
- 自动洗板机
- 多波长酶标仪 (450nm)
- 37℃恒温箱
- 超纯水
- 带有回归分析程序的统计计算机

注意事项

- 所有化学品都应被视为具有潜在危险。建议仅由接受过实验室技术培训的人员操作使用本产品, 并按遵循良好实验室规范的原则。使用时需穿戴合适的防护服, 佩戴好安全眼镜和手套。应注意避免试剂接触到皮肤或眼睛。如果接触到, 立即用大量水冲洗。具体建议见材料安全数据表(SDS)和/或安全声明。
- 试剂仅供研究使用, 不得用于诊断或治疗。
- 请勿将其他批次或其他来源的试剂混合使用或替换。
- 请勿使用标签上过期的试剂盒试剂。
- 在储存或孵育过程中, 请勿将试剂盒试剂暴露在强光下。
- 取用试剂时, 禁止用嘴吸取移液管。
- 请勿在处理试剂盒试剂或样本的区域进食或吸烟。
- 处理试剂盒试剂或样本时, 应佩戴橡胶或一次性乳胶手套。避免皮肤或粘膜接触试剂盒试剂或样本。
- 避免底物溶液与氧化剂和金属接触。
- 避免飞溅或产生气溶胶。
- 为避免微生物、试剂或样本的交叉污染而导致测试无效, 请使用一次性移液器吸头和/或移液器。
- 使用洁净的专用试剂容器分装结合物和底物试剂。暴露在酸中会使结合物失活。
- 试剂稀释和配制需用蒸馏水或纯水。
- 底物溶液使用前必须恢复至室温。
- 被污染的材料或疑似粘有传染性病原体的样本需进行净化处理后再行丢弃。首选方法是121℃下灭菌至少1小时。
- 不含酸的液体废物和中和废物可用1.0%次氯酸钠处理30分钟后排放。酸性液体废物在添加次氯酸钠之前必须先中和。

试剂配制

- 浓缩缓冲液稀释前需恢复至室温。
- 如果浓缩缓冲液中有结晶, 可以预热至结晶溶解后再稀释, 结晶不影响试剂盒性能。

1×清洗缓冲液:

- 将20×浓缩清洗缓冲液(50mL)全部倒入干净的容器中。用蒸馏水或纯化水定容至1000 mL。也可以根据使用量, 配制所需体积的清洗缓冲液。
- 轻轻搅拌以避免产生泡沫。
- 清洗缓冲液需储存在2~25℃。



清洗缓冲液配制后在3天内使用, 过期可能会影响实验结果!

1×生物素偶联抗兔IgG检测抗体:

用1×抗体稀释液以1:30的比例稀释浓缩的生物素偶联抗兔IgG检测抗体。



检测抗体稀释后需在30min内使用, 请勿使用过期产品!

1×链霉亲和素-HRP:

用1×HRP稀释液以1:30的比例稀释浓缩的链霉亲和素-HRP。



链霉亲和素-HRP稀释后需在30min内使用, 请勿使用过期产品!

冻干兔IgG标准品:

- 加入1×标准品&样本通用稀释液1 mL至冻干标准品中, 静置15分钟, 待其充分溶解后, 轻轻混匀, 以确保干粉完全溶解, 复溶后标准品的浓度为5000pg/mL。
- 复溶后的标准品一次性使用, 请勿将剩余的标准品重复使用。
- 复溶后的标准品用1×标准品&样本通用稀释液直接在微孔板或其他干净的样品管中稀释。
- 标准品稀释方法:
 - 1) 取7个干净样品管, 分别标记为: S1、S2、S3、S4、S5、S6、S7。
 - 2) 在样品管S1中加入225μL通用稀释液, S2~S7中分别加入225μL通用稀释液。
 - 3) 在S1管中加入225 μL复溶标准液(**S1浓度=2500 pg/mL**)。
 - 4) 从S1管中取225 μL样品移至S2管中, 混合均匀。
 - 5) 重复上述操作, 连续稀释至S7管。以此创建标准曲线(见图6)。
 - 6) 以通用稀释液作为空白对照。

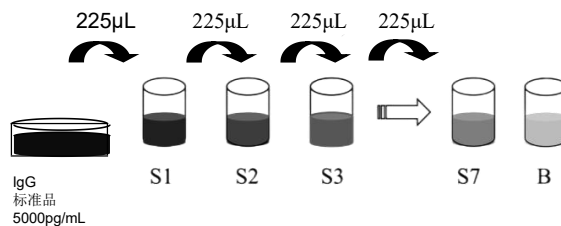


图6. IgG标准品梯度稀释示意图

试剂盒操作流程

1. 根据待测样品的数量、标准曲线和空白对照等确定测试所需孔条的数量。为确保数据可信度, 每个待测点至少需要两个重复孔。从孔条支架上取下额外的微孔条, 并将其装回铝箔袋中, 重新放置2~8°C下储存。
 2. 用350 μ L的清洗缓冲液洗涤微孔条每个孔至少2次, 每次洗涤完, 彻底吸出微孔中残留物。保持清洗缓冲液在孔中停留约10~15秒。不要刮伤微孔的表面。完成最后一个清洗步骤后, 吸干孔内残留, 并在吸水垫或纸巾上轻敲微孔条以去除多余的清洗缓冲液。清洗后立即使用微孔板条, 或者将微孔条倒置在湿吸水纸上不超过15分钟, 以免微孔干燥。
 3. 按照表1, 依次加入100 μ L不同浓度梯度的标准品。加入100 μ L通用稀释液作为空白对照。
14. 向每个孔中迅速加入100 μ L终止液。并尽快读取显色结果(3min内)。
 15. 选择主波长450nm(任选610~650nm作为参考波长), 测定每个微孔的吸光值。

表1. 样品、标准品加样示例

	1	2	3	4
A	标准品A1 2500pg/mL	标准品A1 2500pg/mL	样品A	样品A
B	标准品B1 1250pg/mL	标准品B1 1250pg/mL	样品B	样品B
C	标准品C1 625pg/mL	标准品C1 625pg/mL	样品C	样品C
D	标准品D1 312.5pg/mL	标准品D1 312.5pg/mL	样品D	样品D
E	标准品E1 156pg/mL	标准品E1 156pg/mL	样品E	样品E
F	标准品F1 78pg/mL	标准品F1 78pg/mL	样品F	样品F
G	标准品G1 39pg/mL	标准品G1 39pg/mL	样品G	样品G
H	空白	空白	样品H	样品H

4. 在待测样品孔中加入100 μ L待测样本。
5. 用封板膜覆盖后, 37°C恒温箱避光孵育90分钟。
6. 去除液体, 用350 μ L清洗缓冲液洗板5次。
7. 向所有孔中加入100 μ L 1 \times 生物素化检测抗体。
8. 封板后, 37°C恒温箱, 避光孵育60分钟。
9. 去除液体, 用350 μ L清洗缓冲液洗板5次。
10. 向所有孔中添加100 μ L 1 \times 链霉亲和素-HRP。
11. 封板后, 37°C 避光孵育30分钟。
12. 去除液体, 用350 μ L清洗缓冲液洗板5次, 每次加入清洗缓冲液时, 保持浸润15~30秒。
13. 向所有孔中添加100 μ L TMB底物溶液。37°C恒

数据处理与分析

- 计算每组标准品和样品的平均吸光值, 偏差应 $\leq 20\%$ 。
以免IgG浓度为横坐标、标准品的平均吸光值为纵坐标, 绘制标准曲线。建议使用4或5参数、多项式、log-log等曲线拟合方法绘制最佳拟合曲线。
- 通过样品的平均吸光值, 确定待测样品中IgG的浓度。
- 当计算的浓度超过线性范围内的最大值时, 样本需要进一步稀释, 以便精确定量。
- 典型的标准曲线如图7所示。因操作条件的不同, 每次进行实验时, 应当重新绘制标准曲线。确保结果准确。

标准曲线的吸光值可能因分析条件差别而异(例如, 操作员、移液偏差、清洗效果或温度等条件影响)。此外, 试剂盒的保存期可能影响酶活性, 从而影响显色效果。显色效果差异一般不影响实验结果。

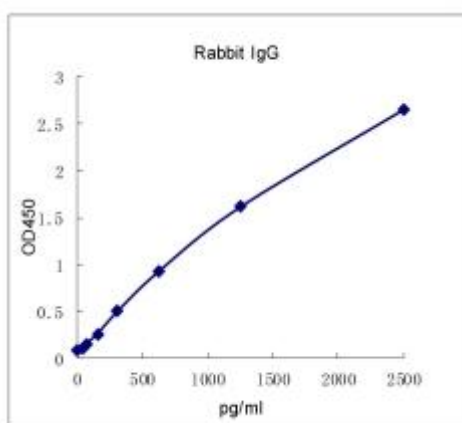


图7. 典型兔IgG ELISA的标准曲线

限制因素

- 由于样品分析因检测条件而异, 因此每次运行都必须建立新标准曲线。
- 样本或试剂因生物污染或试剂之间的交叉污染可能会导致错误的结果。
- 尽量采用干净一次性移液器吸头、容器等, 对于可重复使用的玻璃器皿, 必须在清洁后使用, 并彻底冲洗掉所有清洁剂。
- 不适当或不充分的清洗将导致假阳性或假阴性结果。
- 在任何新的清洗流程之前需完全吸干残余的溶液, 按照每个步骤要求进行清洗, 不要让孔长时间敞开或干燥。

试剂盒性能

灵敏度

本试剂盒对兔IgG的灵敏度为**19.5 pg/mL**。

重现性

批内分析

通过已知浓度的3个样品, 同一块板上测定10次评估批内差异, 分析结果(见表3)。总批内变异系数为5.5%。

批间分析

通过已知浓度的3个样品, 经过2个以上批次的试剂盒, 且经过3个不同实验员的测定8次评估批间差异, 分析结果(见表3)。总批间变异系数为6.4%。

表3. 试剂盒批内与批间分析

样品编号	批内分析			批间分析		
	No.1	No.2	No.3	No.1	No.2	No.3
测定次数	10	10	10	8	8	8
浓度均(pg/ml)	518.1	205.6	105.3	510.5	209.6	106.6
C.V(%)	4.9	5.3	6.2	6.2	5.8	7.1

加标回收

通过将4个浓度的兔IgG掺入正常血清样品来评估回收率。在3个独立的实验中进行测定, 每个实验重复8次。在这些实验中, 以未加标血清用作空白。总平均回收率为98%。注意: 回收率差异取决于所用的血清。

稀释平行性

不同浓度兔IgG的三个血清样品以4个连续梯度的2倍稀释(1:2-1:16), 每个重复4次, 总平均回收率为101%。注意: 回收率取决于所用的血清。

特异性

通过将正常生理浓度的干扰因子掺入兔IgG阳性血清中, 来评估因子的干扰。未检测到交叉反应。