



## 小鼠免疫球蛋白 G (IgG) 酶联免疫吸附检测试剂盒

应用：定量检测蛋白纯化过程及终产物中小鼠 IgG 残留 (如纯化发酵液，细胞培养上清液等)

产品编号：NE03I0431

本试剂盒仅供科研使用，不得用于临床及诊断使用！

### 目录

一、 背景介绍.....	2
二、 实验原理.....	2
三、 试剂盒改进.....	2
四、 提供的试剂及材料.....	3
五、 实验需要但试剂盒未提供的材料.....	3
六、 样本收集和保存.....	4
七、 实验前的准备.....	4
八、 试剂的准备.....	5
九、 操作步骤.....	5
十、 注意事项.....	7
十一、 数据处理.....	8
十二、 质量控制.....	9
十三、 安全注意事项.....	10
十四、 联系我们.....	10



## 一、背景介绍

小鼠免疫球蛋白 G (Mouse Immunoglobulin G) 是血清中免疫球蛋白主要成分, IgG 主要由脾、淋巴结中的浆细胞合成和分泌, 以单体形式存在。IgG 约占血清中免疫球蛋白总量的 75%。在体液中的正常值在 mg/mL 级别, 其中 40%-50% 分布在血清中, 其余分布在组织中。小鼠和动物的免疫血清中的免疫球蛋白极不均一, 其组成、结构、大小、电荷、生物学活性等都有很大差异, 约占机体全部血清蛋白的 20~25%。目前已在小鼠、小鼠等血清中先后分离纯化得到 5 类免疫球蛋白, IgG、IgM、IgA、IgD、IgE。根据 IgG 分子中  $\gamma$  链抗原性差异, 小鼠 IgG 分为 4 个亚类即 IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3。小鼠 IgG 可通过经典途径活化补体, 其固定补体的能力依次 IgG2b > IgG2a > IgG3, IgG1 无固定补体的能力。

## 二、实验原理

本试剂盒采用酶联免疫吸附实验双抗夹心法检测样本中 Mouse IgG 的浓度。首先将样本或者标准品加入预包被有山羊抗鼠抗体的微孔中, 利用抗原抗体特异性结合的特点在特定条件下孵育, 使样本及标准品中的 IgG 被捕获于聚丙烯微孔板上。然后洗板, 洗去其它未结合的物质, 加入偶联生物素的羊抗鼠抗体, 室温条件下孵育, 使包被抗体、Mouse IgG 及检测抗体形成双抗夹心复合物。洗板, 再加入偶联亲和素的 HRP, 产生级联放大效应。最后加入显色底物溶液。显色结束后, 加入硫酸溶液终止反应, 颜色由蓝色变成黄色。样本或者标准品中 IgG 的含量与显色颜色深浅成正比, 据此可以计算待检样本中 Mouse IgG 的含量。

## 三、试剂盒改进

- (1) 特异性高: 包被抗体与检测抗体分别识别同一抗原的不同特异性表位, 增加了反应的特异性, 同类细胞因子之间没有交叉反应。
- (2) 敏感性高: 检测抗体偶联生物素, 与亲和素之间多价高亲和力, 级联放大效应使得实验敏感度增加。
- (3) 稳定性高: 实验采用的是优质的包被抗体和抗原, 并使用了特定的广谱蛋白稳定剂, 和微孔板处理工艺, 增加微孔板热稳定性和结果的可重复性。
- (4) 样本稀释液优化: 使用针对小鼠血清样本优化后的特异性的缓冲液, 排除样本基质干扰,



适用于血清，血浆等常规样本的细胞因子定量检测。

#### 四、提供的试剂及材料

请将按照试剂标签提示的贮存条件存放试剂，并在保质期前使用。

封	名称	规格	数量	保存
1	已包被平底微孔板	96 孔	1 板 (可拆卸)	2-8℃ 密封冷藏
2	标准品母液 (5μg/mL)	20μL	1 瓶	2-8℃ 冷藏
3	检测抗体母液 (100×)	150μL	1 瓶	2-8℃ 冷藏
4	酶液 (HRP, 200×)	100μL	1 瓶	2-8℃ 冷藏
5	稀释液 (10×)	10mL	1 瓶	2-8℃ 冷藏
6	TMB	10mL	1 瓶	2-8℃ 避光冷藏
7	终止液	10mL	1 瓶	2-8℃ 冷藏
8	洗液 (100×)	10mL	1 瓶	2-8℃ 冷藏
9	封板膜		4 张	
10	使用说明书		1 份	

#### 五、实验需要但试剂盒未提供的材料

- 1) 10-1000μL 移液器及一次性灭菌吸头
- 2) 多道移液器
- 3) 灭菌的去离子水或超纯水 1L
- 4) 灭菌 EP 管
- 5) 吸水纸
- 6) 酶标仪
- 7) 高速离心机
- 8) 洗板机或者洗瓶
- 9) 恒温箱或水浴锅 (可选)
- 10) 数据分析及绘图软件



11) PBS(pH 7.4)的配制比例:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.2g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.9g,  $\text{NaCl}$  8g,  $\text{KCl}$  0.2g, 用蒸馏水稀释至 1000mL。

## 六、样本收集和保存

- 1) 血清: 血液采集时不加抗凝剂, 室温静置 1-2 小时,  $1000 \times g$  (或 3000rpm) 离心 15 分钟, 取上清,  $-20^\circ\text{C}$  或  $-80^\circ\text{C}$  分装保存备用。
- 2) 血浆: 血液采集时要加入总体积 1% 的抗凝剂 (EDTA、肝素等), 采集后先室温或  $4^\circ\text{C}$  静置半小时后,  $1000 \times g$  (或 3000rpm) 离心 15 分钟, 取上清,  $-20^\circ\text{C}$  或  $-80^\circ\text{C}$  分装保存备用。
- 3) 组织裂解液: 组织裂解的方式取决于组织的类型, 一般来讲, 先用预冷的 PBS 清洗组织后称重。一般 0.3g-0.5g 组织加入 500 $\mu\text{L}$  预冷的 PBS, 在冰上的玻璃容器内研碎。用超声或者反复冻融的方法裂解细胞膜,  $1500 \times g$  (或 5000rpm) 离心 15 分钟分钟后取上清,  $-20^\circ\text{C}$  或  $-80^\circ\text{C}$  分装保存备用。
- 4) 细胞裂解液: 悬浮细胞直接离心取细胞沉淀。贴壁细胞需用胰酶消化后离心取细胞沉淀。检测某些指标时不能用胰酶消化。用 PBS 洗 3 遍。用少量 PBS 重悬细胞, 超声或者反复冻融的方法裂解细胞膜,  $1500 \times g$  (或 5000rpm) 离心 15 分钟分钟后取上清,  $-20^\circ\text{C}$  或  $-80^\circ\text{C}$  分装保存备用。
- 5) 细胞上清液: 收集培养的细胞,  $1000 \times g$  (或 3000rpm) 离心 15 分钟, 取上清,  $-20^\circ\text{C}$  或  $-80^\circ\text{C}$  分装保存备用。

## 样本准备注意事项:

- ◆ 样本收集完毕后, 要分装保存在  $-20^\circ\text{C}$  (少于 3 个月) 或  $-80^\circ\text{C}$  (少于 6 个月) 以保持蛋白活性和避免污染。避免反复冻融 如果要在 24 小时内分析样本, 可以保存在  $2-8^\circ\text{C}$ 。
- ◆ 某些化学裂解液可能会对本实验造成干扰, 比如 SDS, Triton。谨慎使用。
- ◆ 样本液中含有沉淀物会对 ELISA 有干扰, 务必离心去除。
- ◆ 不要使用高脂血或溶血的样本, 对 ELISA 有干扰, 导致检测结果不准确。
- ◆ 不能加热来融化样本。

## 七、实验前的准备

- 1) 请仔细阅读试剂盒说明书。



- 2) 样本的准备：将化冻后的冻存样本，混匀后，12000rpm 离心 1min，取上清作为待检样本备用。
- 3) 样本的稀释倍数：如果您的样本预测浓度高于本试剂盒最高检测限度，建议使用 PBS 对样本进行稀释。根据实验室建议，一般情况下至少稀释倍数 10000 倍，可根据实际情况调整稀释倍数。

#### 注意：

- ◆ 若您使用说明书中未列举的样本，请进行预实验看本试剂盒是否适合您的实验。
- ◆ 由于在细胞稳定性，细胞数目，及采样时间上存在差异，细胞培养上清样本可能无法被本试剂盒检测。
- ◆ 建议您使用新鲜的或者储存时间不长的样本用于分析测试。否则，样本中蛋白质的降解及变性会导致错误的实验结果。
- ◆ 实验样本的最佳 PH 值在 7.0-7.4 之间。

#### 八、试剂的准备

- 1) 试剂盒内所有试剂及包被板，请在使用前的 30min 拿出，使其恢复室温。
- 2) 洗液的稀释：量取 10mL 100×洗液母液，加入 990mL 去离子水或超纯水，混匀备用。如果浓缩液中有少许结晶，请将其置于室温，并轻轻震荡至晶体完全溶解。1×洗液在 2-8℃ 中可以稳定保存 2 周。
- 3) 稀释液（1×）的准备：将 10mL 稀释液（10×），加入 90mL 去离子水或超纯水，混匀备用。如果浓缩液中有少许结晶，请将其置于室温，并轻轻震荡至晶体完全溶解。

#### 九、实验步骤

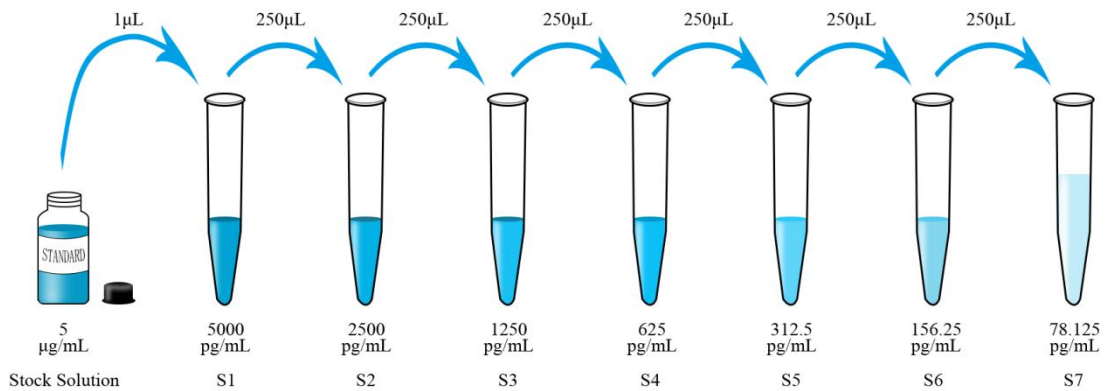
- 1) 撕开包装袋，取出包被有抗体的酶标板，拆下不需要使用的板条，并用封板膜封好，放回铝箔袋，重新放回4℃保存。（板架可重复使用）
- 2) 标准品的稀释：  
配置标准品时提前标记 7 只样品稀释管，预加入一定体积的稀释液，其中 S1(1000μL),S2 至 S7(各 250μL)  
  
取 1μL 标准品母液（浓度为 5μg/mL）加入到标记为 S1 的管，吹打混匀后，取 250μL 浓

度为 5ng/mL 的标准品 S1 到下一管,之后以 2 倍梯度稀释至 S7 (稀释过程如下图)。

取 100 $\mu$ L 标准品及样本 (原液或稀释液) 加入微孔板中。

空白对照(Blank Control)加入 100 $\mu$ L 的样本稀释液即可。

注: 标准曲线有 7 个点, 分别命名为 S1、S2、S3……S7。其中 S1 即标准曲线的最高浓度点 (5000pg/mL)。



3) 封板膜将酶标板用封板膜密封后室温振荡孵育1.5h

4) 洗板机洗板:

- 取出稀释好的洗液放置于洗板机的洗瓶中备用。
- 取出上步中的微孔, 甩去微孔中的液体, 洗板机洗板5次。
- 洗板完成后, 将微孔板倒扣在吸水纸上拍打, 充分拍干至无明显水膜为止。

或手动洗板:

- 取出稀释好的洗液放置于洗瓶中备用。
- 取出上步中的微孔, 甩掉微孔中的液体, 在吸水纸上轻轻拍打至无明显液滴。
- 用多道移液枪向每个微孔中加300 $\mu$ L洗液, 静置20s, 倒去洗液, 将微孔板倒扣在吸水纸上轻轻拍打。重复5次。注: 第五次洗板时, 充分拍干至无明显水膜为止。

5) 加检测抗体: 取100 $\mu$ L检测抗体母液 (100 $\times$ ) 加入到10mL稀释液 (1 $\times$ ) 中, 轻轻震荡混匀, 使其充分稀释至工作浓度后 (1 $\times$ ), 各孔加100 $\mu$ L溶液, 贴上封板膜, 室温孵育1h。然后洗板, 按步骤3操作。



- 6) 加入HRP：取50 $\mu$ L HRP母液（200 $\times$ ）加入到10mL稀释液（1 $\times$ ）中，轻轻震荡混匀，使其充分稀释至工作浓度后（1 $\times$ ），各孔加100 $\mu$ L溶液，贴上封板膜，室温孵育45min。然后洗板，按步骤3操作。
- 7) 显色：向每个孔中加入100 $\mu$ L底物TMB，轻轻震荡30s混匀，贴上封板膜，置于室温显色10-30min。  
**注：**显色时间因实验室条件（温度、湿度等）会有一定差异。
- 8) 显色终止及读板：直接向含有底物的微孔中加入50 $\mu$ L的终止液，终止反应，轻轻震荡混匀，立即转移到酶标仪上，在450nm下读取吸光度值。

## 十、注意事项

### （一）样本收集注意事项

- 1、样本收集完毕后，要分装保存在-20 $^{\circ}$ C（少于3个月）或-80 $^{\circ}$ C（少于6个月）以保持蛋白活性，避免污染和反复冻融。如果要在24小时内分析样本，可以保存在2-8 $^{\circ}$ C。
- 2、采集样本后如果短期内不使用，请将样本分装后冷冻保存，避免反复冻融。冷冻样本使用前请保证充分化冻，使用前用移液器或者Vortex混匀，可离心除去絮状不溶物。
- 3、若母液（标准品，检测抗体及酶液）出现浑浊，轻轻振荡或吹打即可。
- 4、建议所有标准品及样本都设置复孔。向微孔中加入试剂或样本后，请轻轻震荡使液体混匀，并尽量保证不要有气泡。
- 5、高脂血或溶血的样本含有丰富的过氧化物酶，对ELISA有干扰，导致检测结果非特异性升高，不建议使用。

### （二）实验操作注意事项

- 1、请不要将本试剂盒的试剂与其他试剂盒试剂交叉使用。
- 2、实验操作使用一次性吸头，避免交叉污染。
- 3、加样：加样时要控制时间和速度，一般加样时间控制在10分钟内。如果样本数量过多，可

使用多道移液器。

4、洗涤：洗涤时微孔中残留的洗涤液应在吸水纸上充分拍干，并要消除板底残留的液体和手指痕迹，避免影响最后的酶标仪读数。

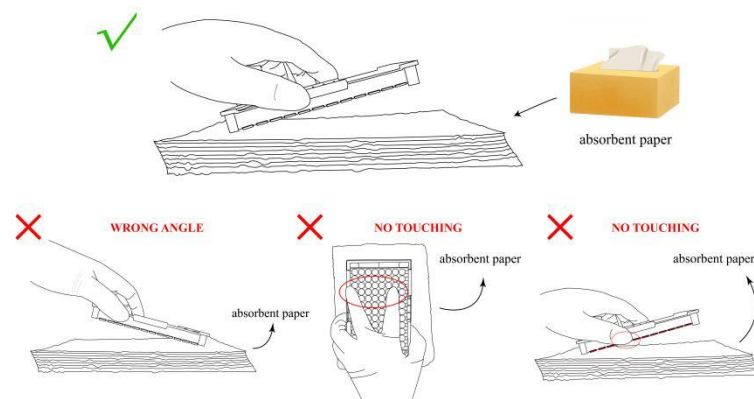
5、由于底物TMB溶液是光感性的试剂，使用前请勿长时间暴露于可见光下。同时要避免TMB与金属接触。

6、反应时间的控制：加入底物后请定时观察反应孔的颜色变化（比如，10分钟左右），如果颜色较深，请提前加入终止液终止反应。

7、本试剂盒中使用了稀硫酸作为终止液，其具有轻微腐蚀性，使用时应避免接触衣物或眼、手等皮肤暴露部位。

8、标准曲线的 $R^2 \geq 0.95$ 。

9、拍板示意图：

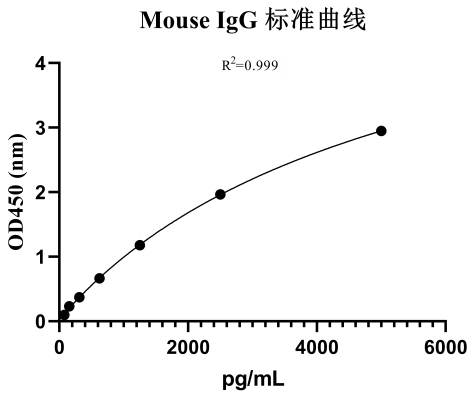


## 十一、数据处理

- 1) 对样本及标准品各自对应的复孔 OD 值取平均值。减去空白孔（即 S8）OD 值后带入标曲。
- 2) 以标准品的 OD 作为 Y 值，标准品的浓度作为 X 值，推荐选择四参数 logistic (4-PL) 曲线拟合。
- 3) 将样本 OD 代入到标准曲线方程中计算样本中待检 IgG 的浓度
- 4) 以下曲线仅供参考。



附件一、标准曲线实例



pg/mL	OD450
5000	2.947
2500	1.965
1250	1.18
625	0.664
312.5	0.373
156.25	0.233
78.125	0.097

十二、质量控制

- 1) 批内差 CV%: 0.28-2.39
- 2) 批间差 CV%: 0.27-2.92
- 3) 回收率%: 91.9-112
- 4) 线性:

	Range %	Average Linearity %
1:5×10 <sup>5</sup>	98.95	99.98
1:10×10 <sup>5</sup>	99.7	100.1
1:20×10 <sup>5</sup>	101	100.4

- 5) 灵敏度: 29.3 pg/mL
- 6) 特异性/交叉反应性:

Sample	Cross reactivity (%)
Bovine IgG	0.001
Goat IgG	---
Human IgG	---

- 7) 钩状效应 (Hook Capacity)

本试剂盒是一个三步法的夹心 ELISA 试剂盒，样本在高含量 IgG 的情况下会受到钩状效应的影响。本试剂盒样本线性范围大于 100000 倍，供参考使用。请用试剂盒稀释液稀释样本，使其 IgG 浓度在本试剂盒的检测范围以内。



样本稀释倍数	OD 值
1	0.34
10	0.605
100	0.974
1000	1.043
10000	0.997
100000	0.592
1000000	0.14

#### 8) 局限性

本试剂盒不适用于含有叠氮化钠( $\text{NaN}_3$ )的样本, 因为叠氮化钠是 HRP 的强抑制剂, 会降低检测到目的蛋白的浓度。

### 十三、安全注意事项

- 1) 本试剂盒显色底物 TMB 3, 3', 5, 5' -Tetramethylbenzidine (TMB), 有一定的致病风险。  
如果接触到 TMB, 请用大量的水冲洗。
- 2) 终止液是硫酸溶液, 请勿让眼睛皮肤及衣物接触终止液。操作时戴上手套, 实验服及面罩。

### 十四、联系我们

公司地址: 上海市浦东新区紫萍路889弄6号楼(张江基因岛6号楼赛唐生物)

网址: [www.cellgenebio.com](http://www.cellgenebio.com) 或 [www.bluegene.cc](http://www.bluegene.cc) 或 [www.elisakit.cc](http://www.elisakit.cc)

联系电话: 400-882-6373/021--61106433/021--61106434/021-61106435/021--61106436

国内市场部	
售前一	QQ: 2247355151 或邮箱: <a href="mailto:sale_bluegene@163.com">sale_bluegene@163.com</a>
售前二	QQ: 3980196069 或邮箱: <a href="mailto:sale_cellgene@163.com">sale_cellgene@163.com</a>
技术部售后	<a href="mailto:tech@bluegene.cc">tech@bluegene.cc</a>
其他咨询	<a href="mailto:sales@bluegene.cc">sales@bluegene.cc</a>