



牛免疫球蛋白 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牛 IgG 残留 (如纯化发酵液，细胞培养上清液等)

产品编号：NE11I0431

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.....	5
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

牛免疫球蛋白 G (Bovine immunoglobulin G) 是牛血清中免疫球蛋白主要成分，分子量约为 160 kDa，其中 40~50% 分布于血清中，其余分布在组织中。IgG 包括四个亚型，IgG1, IgG2, IgG3, IgG4，在血清中的含量为 17-27mg/mL。

牛免疫球蛋白 G (Bovine IgG) 广泛应用于基础生化、教学、科研、生物医药生产等领域。各种通过生物技术流程生产的产品，例如细胞或组织培养基所使用的组分都可能导致所需要的产品残留污染。由于胎牛血清中含有大量牛免疫球蛋白 G，因此经常被用作重组制药生产中培养哺乳动物细胞的介质。在重组制药的纯化过程中，经过工艺优化纯化去除 IgG，在重组蛋白药物以及其他终产品中，仍可能有牛 IgG 的残留。而当产品被用作牛或动物的治疗剂时，牛 IgG 作为一种致敏物质，可能会引起免疫应答反应，影响到牛体健康，甚至直接威胁到患者的生命安全。因此，残留牛 IgG 检测是生物医药制品质量控制中的一个重要环节。

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牛 IgG 的浓度。首先将样本或者标准品加入预包被有兔抗牛抗体的微孔中，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，加入偶联生物素的兔抗牛抗体，室温条件下孵育，使包被抗体、牛 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牛 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：使用针对牛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。

	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、封板膜实验需要但试剂盒未提供的材料

- 1) 10-1000 μL 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: NaH_2PO_4 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, NaCl 8g, 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°C 或 -80°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°C 静置半小时后, $1000 \times g$ (或 3000rpm) 离心 15 分钟, 取上清, -20°C 或 -80°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 μL 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°C 或 -80°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°C 或 -80°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°C 或 -80°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°C (少于 3 个月) 或 -80°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 10 亿倍，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：

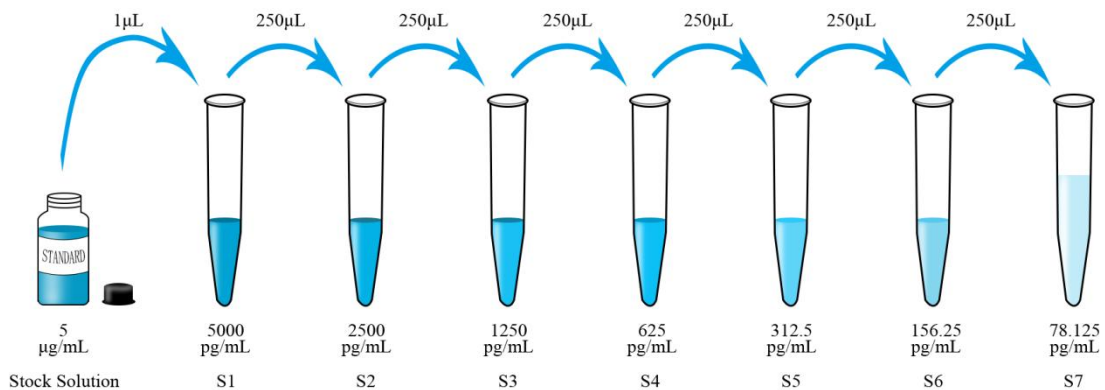
配置标准品时提前标记 7 只样品稀释管，预加入一定体积的稀释液，其中 S1(1000 μ L),S2 至 S7(各 250 μ L)

取 1 μ L 标准品母液（浓度为 5 μ g/mL）加入到标记为 S1 的管，吹打混匀后，取 250 μ L 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ L底物TMB，轻轻震荡30s混匀，贴上封板膜，置于避光的室温恒温培养箱中显色10-30min。
注：显色时间因实验室条件（温度、湿度等）会有一些差异。
- 8) 显色终止及读板：直接向含有底物的微孔中加入50 μ 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

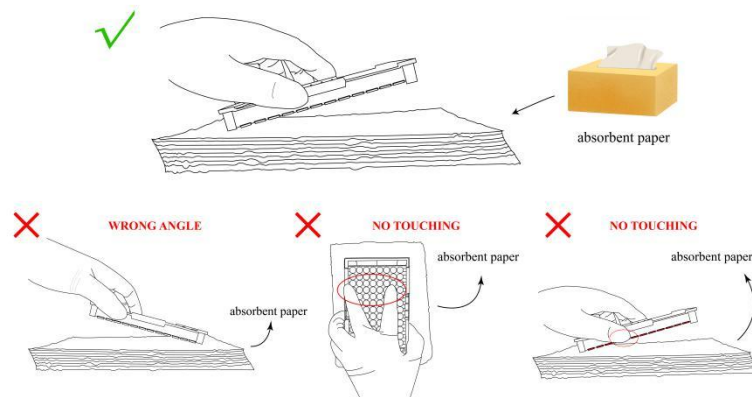
（一）样本收集注意事项

- 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 $R^2 \geq 0.95$ 。

◆ 拍板示意图：

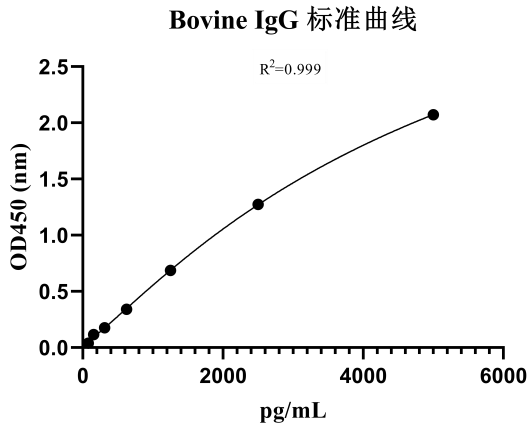


十一、数据处理

- 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	2.072
2500	1.273
1250	0.687
625	0.341
312.5	0.177
156.25	0.116
78.125	0.038

十二、质量控制

- 1) 批内差 CV%: 0-4
- 2) 批间差 CV%: 5-13
- 3) 回收率%: 65-100
- 4) 线性:

稀释倍数	Range %	Average Linearity %
2.22×10^6	87.54-100.00	93.77
4.44×10^6	100.10-103.98	102.04
8.88×10^6	98.75-107.51	103.13
1.78×10^7	101.64-105.10	103.37
3.55×10^7	100.80-102.80	101.80

- 5) 灵敏度: 26.8 pg/mL
- 6) 特异性/交叉反应性:

Sample	Cross reactivity (%)
Mouse IgG	0.033
Goat IgG	0.266
Human IgG	0.019

- 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。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	1.646
10	3.763
1000	3.448
100000	3.6
10000000	3.685
1000000000	3.258
10000000000	1.618

8) 局限性

本试剂盒不适用于含有叠氮化钠(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 或 www.bluegene.cc 或 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: sale_bluegene@163.com
售前二	QQ: 3980196069 或邮箱: sale_cellgene@163.com
技术部售后	tech@bluegene.cc
其他咨询	sales@bluegene.cc