



人免疫球蛋白 M (IgM) 酶联免疫吸附检测试剂盒

应用：定量检测血清、血浆、蛋白纯化过程及终产物中人 IgM 残留

(如纯化发酵液，细胞培养上清液等)

产品编号：NE01I0038

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、 试剂盒优势.....	2
四、 试剂盒组分.....	2
五、 实验需要但未提供的耗材及设备.....	3
六、 样本收集和保存.....	3
七、 实验前的准备.....	4
八、 试剂的准备.....	4
九、 操作步骤.....	4
十、 注意事项.....	6
十一、 数据处理.....	7
十二、 质量控制.....	7
十三、 安全注意事项.....	8
十四、 联系我们.....	9



一、背景介绍

免疫球蛋白 (Ig) 是一组具有特殊的化学结构和免疫功能的球蛋白，存在于体液内和淋巴细胞表面，是抗体的物质基础。按结构和功能的不同分为五大类: IgG, IgM, IgA, IgD 和 IgE。其分子大小、电荷、氨基酸组成和碳水化合物含量很不均一。Ig 分子具有结合抗原和刺激抗体生成的双重功能。

免疫球蛋白 M (IgM) 在 B 淋巴细胞生成的早期阶段先在细胞内表达，随后会在骨髓中更成熟的 B 细胞表面以及外周 B 细胞表面表达。

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人 IgM 的浓度。首先将样本或者标准品加入预包被有山羊抗人抗体的微孔中，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 IgM 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，加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗人抗体，室温条件下孵育，使包被抗体、人 IgM 及检测抗体形成双抗夹心复合物。洗板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 IgM 的含量与显色颜色深浅成正比，据此可以计算待检样本中人 IgM 的含量。

三、试剂盒优势

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，同类型指标之间没有交叉反应。
2. 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。
3. 样本稀释液优化：使用针对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，血浆等常规样本的定量检测。

四、试剂盒组分

请将按照试剂标签提示的贮存条件存放试剂，并请在保质期前使用。

	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 (10μg/mL)	10μL	1 瓶	2-8℃ 冷藏



3	HRP标记检测抗体母液 (100×)	150μL	1 瓶	2-8℃ 冷藏
4	稀释液 (10×)	10mL	1 瓶	2-8℃ 冷藏
5	TMB	10mL	1 瓶	2-8℃ 避光冷藏
6	终止液	10mL	1 瓶	2-8℃ 冷藏
7	洗液 (20×)	10mL	5 瓶	2-8℃ 冷藏
8	封板膜		4 张	
9	使用说明书		1 份	

五、实验需要但未提供的耗材及设备

1. 移液器：10μL-1000μL
2. 灭菌的去离子水或超纯水 1L
3. 吸水纸
4. 高速离心机
5. 恒温箱或水浴锅 (可选)
6. PBS (pH 7.4) 配制方法：NaH₂PO₄ 0.2g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9g, NaCl 8g, KCl 0.2g, 用蒸馏水稀释至 1000mL。
7. 多道移液器
8. 灭菌 EP 管
9. 酶标仪
10. 洗板机或者洗瓶
11. 数据分析及绘图软件

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×g (或 3000rpm) 离心 15 分钟，取上清，-20℃ 或 -80℃ 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℃ 静置半小时后，1000×g (或 3000rpm) 离心 15 分钟，取上清，-20℃ 或 -80℃ 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 500μL 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×g (或 5000rpm) 离心 15 分钟分钟后取上清，-20℃ 或 -80℃ 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×g (或 5000rpm) 离心 15 分钟分钟后取上清，-20℃ 或 -80℃



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。

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 1 分钟，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。首次实验建议多设置几个稀释倍数，相邻浓度间 10 倍稀释。

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 30 分钟拿出，使其恢复室温。
2. 洗液的稀释：取 5 瓶体积为 10mL 的 $20\times$ 洗液母液，加入 950mL 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。 $1\times$ 洗液在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 中可以稳定保存 2 周。
3. 稀释液（ $1\times$ ）的准备：将 10mL 稀释液（ $10\times$ ），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、操作步骤

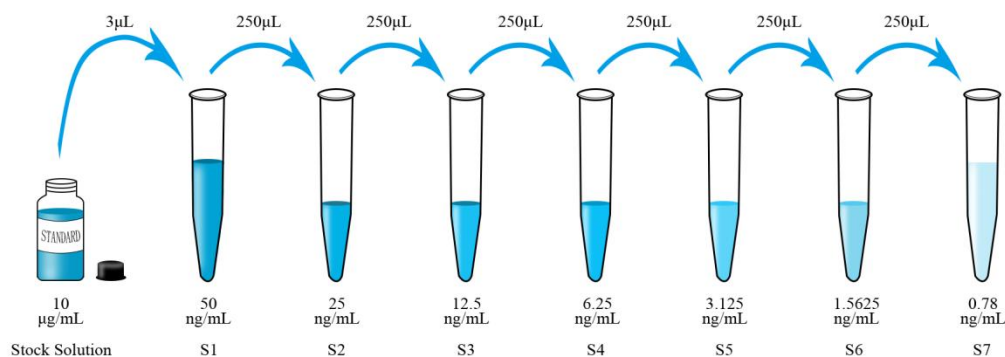
1. 撕开包装袋，取出包被有抗体的酶标板，拆下不需要使用的板条，并用封板膜封好，放回铝箔袋，重新放回 4°C 保存。（板架可重复使用）
2. 标准品的稀释：配置标准品时提前标记 7 支样品稀释管，预加入一定体积的稀释液，其中

S1 (597 μ L), S2至S7 (各250 μ L)。取3 μ L标准品母液 (浓度为10 μ g/mL) 加入到标记为S1的管, 吹打混匀后, 取250 μ L浓度为50ng/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 (50ng/mL)。



3. 将酶标板用封板膜密封后室温振荡孵育1.5小时。

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20秒, 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 HRP标记检测抗体母液 (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1小时。然后洗板, 按步骤4操作。

6. 显色: 向每个孔中加入100 μ L底物TMB, 贴上封板膜, 置于室温避光静置显色10-30分钟。

注: 显色时间因实验室条件 (温度、湿度等) 会有一定差异。



7. 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

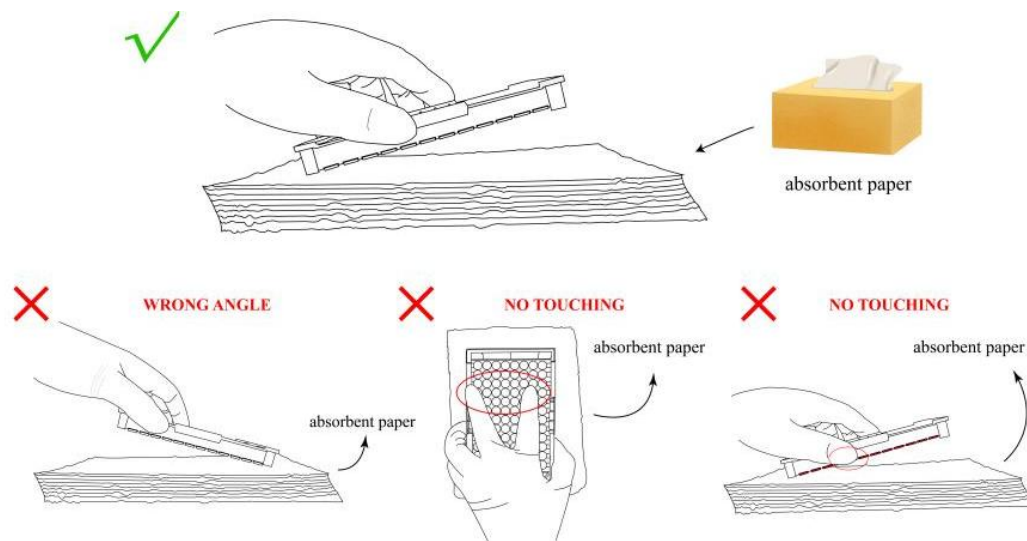
（一）样本收集注意事项

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. 冷冻样本使用前请保证充分化冻（请勿加热融化样本），使用前用移液器或者Vortex混匀，样本液中含有沉淀物会对ELISA有干扰，可离心去除。
3. 某些化学裂解液（如SDS，Triton等）可能会对本实验造成干扰，谨慎使用。
4. 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。
5. 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。
6. 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. 请勿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. 加样时需控制时间和速度，一般控制在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，避免影响最终的酶标仪读数。
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。

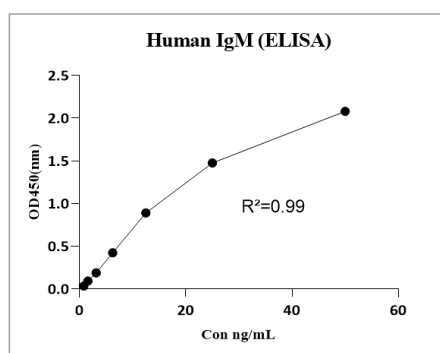
7. 本试剂盒中使用了稀硫酸作为终止液，其具有轻微腐蚀性，使用时应避免接触衣物或眼、手等皮肤暴露部位。
8. 标准曲线的 $R^2 \geq 0.95$ 。
9. 拍板示意图：



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 IgM 的浓度。
4. 以下曲线仅供参考。

附件一、标准曲线实例



	Con ng/mL	OD450
S1	50	2.081
S2	25	1.477
S3	12.5	0.890
S4	6.25	0.424
S5	3.125	0.188
S6	1.5625	0.092
S7	0.78	0.035

十二、质量控制

1. 批内差 CV%: 6-7 批间差 CV%: 7-9



2. 回收率%:

加标浓度	加标比例	回收率%
高	3: 1	80-120
中		90-120
低		90-120

3. 线性:

稀释倍数	范围%
1:2	99.5-100.7
1:4	98.5-102
1:8	94.6-103.3
1:16	92.7-108.5
1:32	97.2-106.8
1:64	93.3-110.5

4. 灵敏度: LOD: 0.19ng/mL LOQ: 0.78ng/ml

5. 特异性/交叉反应性:

Sample	Cross reactivity (%)
Mouse IgG	NA
Bovine IgG	NA
Human IgG	NA
Human IgA	NA

6. 钩状效应 (Hook Capacity) : 本试剂盒是 2 步法夹心 ELISA, 样本在高浓度 IgM 的情况下会受到钩状效应的影响。可使用稀释液将样本浓度稀释至本试剂盒的检测范围以内。

7. 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）

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: 3247299548 或邮箱: sale_cellgene@163.com
技术部售后	tech@bluegene.cc
其他咨询	sales@bluegene.cc