

小鼠免疫球蛋白 G2b 酶联免疫吸附测定试剂盒

产品编号：MA0782 规格：96 次

产品内容

产品组成	体积/数量
IgG2b 预包被板	8 孔条×12 个
样品稀释液	30mL
重组 IgG2b 标准品(冻干)	2 支(10ng/支)
生物素标记 IgG2b 抗体	130 μL(效价 1:100)
抗体稀释液	12mL
酶复合物(HRP 标记的链霉亲和素)	130 μL(效价 1:100)
酶复合物稀释液	12mL
浓缩洗涤液(25×)	30mL
显色剂 TMB	10mL
终止液	10mL
封板胶纸	4 张

产品简介

本试剂盒采用双抗体夹心ELISA法，用于检测样品中IgG2b的浓度。IgG2b 捕获抗体已经预包被于酶标板上，当加入样品或标准品时，其中的 IgG2b 会与捕获抗体结合，而其它游离成分则会通过洗涤被除去。接着，再加入生物素标记的 IgG2b 抗体后，抗 IgG2b 抗体与 IgG2b 接合，形成夹心的免疫复合物，其它游离成分则通过洗涤被除去。随后加入酶复合物，生物素与酶复合物特异性结合，这样酶复合物上的 HRP 就与夹心的免疫复合物连接起来，而其它游离成分则通过洗涤被除去。最后加入显色剂，若样品中存在 IgG2b，则会形成免疫复合物，其上连接的 HRP 会催化无色的显色剂氧化生成蓝色物质，而后加入终止液，最终产物呈黄色。通过酶标仪检测，读取 450 nm 处的 OD 值，IgG2b 浓度与 OD450 值之间呈正比，通过检测标准品绘制标准曲线，对照未知样品中 OD 值，即可计算出样品中 IgG2b 的浓度。

小鼠 IgG 抗体主要分为四个亚型：IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3。这些抗体亚型具有不同的功能和特点，对于研究免疫应答和疾病发生机制具有重要意义。

与 IgG1 和 IgG2a 相比，IgG2b 在小鼠循环免疫球蛋白中的比例较低。IgG2b 与 IgG1 一样，对补体的激活能力较弱，但其在细胞介导的免疫反应中的作用较明显。IgG2b 可以通过与 FCγR I 和 FCγRIV 结合来调节免疫细胞的活性。

产品参数：

检测范围	0.313 ng/mL~20 ng/mL
敏感性	0.19 ng/mL
特异性	系统和其它因子无交叉反应
样本类型	小鼠血清、血浆、体液、组织匀浆或细胞培养上清



使用方法

(一) 样品制备

1.根据样品种类选择相应的处理方法:

(1) 细胞上清: 将细胞培养上清液100~500×g离心5min, 去除悬浮物后即可。

(2) 血清样品: 将全血在室温下静置0.5~2h, 待其自然凝固并析出血清后, 离心取黄色上清即可(4℃, 1,000~2,000×g, 10min), 注意请勿吸取沉淀, 制备好的血清需置于冰上待用, 请勿在其中添加任何防腐剂或抗凝剂;

(3) 血浆样品: 使用EDTA对全血进行抗凝处理后, 混合均匀置于冰上, 离心取黄色上清即可(4℃, 1,000~2,000×g, 10min), 注意请勿吸取沉淀, 制备好的血浆需置于冰上待用;

(4) 组织匀浆/体液: 离心去除沉淀即可。

注意:

- ①若待测样品无法及时检测, 样品制备完成后, 请分装冻存于-20℃, 避免反复冻融;
- ②请保证待测样品清澈透明, 检测前如发现样品中有悬浮物, 需通过离心去除;
- ③为了保证检测结果准确, 请勿使用溶血、黄疸、高血脂或污染的样品。

2.稀释样本

查阅相关文献, 预估样品中待测因子的含量, 从而确定适当的稀释倍数, 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。根据待测因子含量的不同, 分别采取不同的稀释方案:

(1) 待测因子含量在 200~2,000 ng/mL 范围内, 一般按 1:100 稀释, 即向 297 μL 样品稀释液中加入 3 μL 样品;

(2) 待测因子含量在 20~200 ng/mL 范围内, 一般按 1:10 稀释, 即向 225 μL 样品稀释液中加入25 μL 样品;

(3) 待测因子含量在 0.313~20 ng/mL 范围内, 一般按 1:2 稀释, 即向 100 μL 样品稀释液中加入 100 μL 样品;

(4) 待测因子含量≤0.313 ng/mL, 样品一般无需稀释。

以上方案仅供参考, 实验中请详细记录样品的稀释方法。

(二) 检测准备工作

3.试剂盒自4℃冰箱取出后, 请置于室温平衡20min; 如从-20℃取出, 各组分需彻底融化后再平衡20min; 检测完成后, 剩余试剂请及时置于4℃或-20℃保存。

4.将浓缩洗涤液(25×)用双蒸水或去离子水稀释成1×洗涤液。

5.重组IgG2b标准品的稀释和使用(在使用前2h内准备, 室温操作, 请严格控制在25~28℃)

(1) 配制 20 ng/mL 标准品: 取 1 mL 样品稀释液加入标准品管内, 盖好后静置 15 min 以上, 然后反复颠倒 / 搓动以助溶解;

(2) 按下表将 20 ng/mL 标准品用样品稀释液进行倍比梯度稀释。(最高浓度为 20 ng/mL, 将标准品稀释液作为浓度 0 ng/mL。)



管号	稀释液用量(μL)	复溶后标准品用量(μL)	标准品的最终浓度(ng/mL)
A	0	1000	20
B	300	300(从A管取出)	10
C	300	300(从B管取出)	5
D	300	300(从C管取出)	2.5
E	300	300(从D管取出)	1.25
F	300	300(从E管取出)	0.625
G	300	300(从F管取出)	0.313
H	300	0	0

注意：标准品复溶加样后，剩余部分请丢弃。

6.准备生物素标记IgG2b抗体工作液

(1) 按每孔需添加100 μL 抗体工作液，计算其总用量(为弥补操作中的损耗，需多配制100~200 μL)；

(2) 按1 μL 生物素标记IgG2b抗体添加99 μL 抗体稀释液的比例配制工作液，轻轻混匀。

7.准备酶复合物工作液(需在使用前1h内准备)

(1) 按每孔需添加100 μL 酶复合物工作液，计算其总用量(为弥补操作中的损耗，需多配制100~200 μL)；

(2) 按1 μL 酶复合物添加99 μL 酶复合物稀释液的比例配制工作液，轻轻混匀。

(三) 检测流程

8.通过计算确定一次实验所需的板条数，取出所需板条放置于框架内，多余的板条请放回铝箔袋密封，保存于4 $^{\circ}\text{C}$ 或-20 $^{\circ}\text{C}$ 。

注意：

①标准品和样品建议做双复孔检测；

②每次实验均需绘制标准曲线。

9.将用样品稀释液稀释后的样品和不同浓度标准品(100 μL /孔)分别加入相应孔中，用封板胶纸封住反应孔，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育90min。

注意：

①请查阅相关文献确定样品中待检测蛋白的大致浓度，若其大于本试剂盒标准曲线的最大标准品浓度，请将样品适当稀释后再进行检测；

②整个加样过程不宜超过10min，否则可能会影响检测结果。

10.甩去酶标板内液体，无需洗板，将板倒扣在吸水纸上拍干。

11.加入稀释后的生物素标记IgG2b抗体工作液(100 μL /孔)，用封板胶纸封住反应孔，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育60min。

12.洗板5次，每孔1 \times 洗涤液用量为300 μL ，注入与吸出间隔15~30s，洗完后将板倒扣在吸水纸上拍干。

注意：洗涤过程至关重要，洗涤不充分会导致结果产生较大误差。

13.加入稀释后的酶复合物(100 μL /孔)，用封板胶纸封住反应孔，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30min。

14.洗板5次，方法同步骤12；



15.加入显色剂TMB(100 μ L/孔), 用封板胶纸封住反应孔, 避光37 $^{\circ}$ C反应10~25min。注意:

- ①在保存和使用时, 请勿将TMB接触氧化剂和金属;
- ②因实验室条件差异, 最佳显色时间会有所不同, 反应充分时肉眼可见标准品的前3~4孔有明显的梯度蓝色。

16.加入终止液(100 μ L/孔), 混匀后即刻使用酶标仪测量OD450, 同时设定540nm或570nm作为校正波长, 即可计算得到校正吸光度值(OD450-OD540或OD450-OD570);

注意: 读取OD值建议在10min内完成。

(四) 数据分析

17.绘制标准曲线。以标准品浓度作横坐标, OD值作纵坐标, 利用计算机软件作四参数逻辑(4-PL)曲线拟合创建标准曲线, 通过样品的OD值即可在标准曲线上计算出其相应浓度。

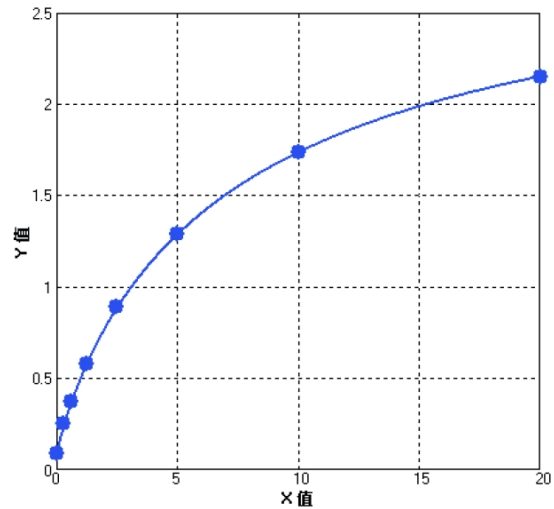
注意:

- ①复孔OD值在20%的差异范围内结果才有效, 复孔OD值取平均后可作为测量值;
- ②若样品OD值高于标准曲线上限, 应适当稀释后重测, 计算浓度时应乘以稀释倍数。

标准曲线范例

IgG2b参考标准曲线

标准品浓度	O.D.
0 ng/mL	0.088
0.313 ng/mL	0.250
0.625 ng/mL	0.375
1.25 ng/mL	0.581
2.5 ng/mL	0.888
5 ng/mL	1.292
10 ng/mL	1.739
20 ng/mL	2.151



注意: 本图仅供参考, 应以同次试验标准品所绘标准曲线计算样品含量。

保存条件

2~8 $^{\circ}$ C保存, 自生产之日起6个月有效; 长期储存请置于-20 $^{\circ}$ C, 自生产之日起12个月有效。

注意事项

- 1.浓缩洗涤液低温情况下可能会出现结晶, 请水浴加热使结晶完全溶解后再配制工作液;
- 2.严禁混用不同批号试剂盒的组分;



- 3.加样过程请避免产生气泡，实验操作过程中一定要保证试剂充分混匀，否则会使结果产生较大误差；
- 4.说明书中提到的室温条件，请严格控制在25~28℃；
- 5.为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；
- 6.本产品仅限科研使用。

J240101

