

人 IgG1 酶联免疫吸附测定试剂盒

产品编号：MA1091 规格：96 次

产品内容

产品组成	体积/数量
人 IgG1 预包被板	8 孔条×12 个
样品稀释液	30 mL
重组人 IgG1 标准品(冻干)	2 支(50 ng/支)
生物素标记人 IgG1 抗体	130 μL(效价 1:100)
抗体稀释液	12 mL
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	12 mL
浓缩洗涤液(25×)	30 mL
显色剂 TMB	10 mL
终止液	10 mL
封板胶纸	4 张

产品简介

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法，用于检测样品中人 IgG1 的浓度。人 IgG1 捕获抗体已经预包被于酶标板上，当加入样品或标准品时，其中的人 IgG1 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人 IgG1 抗体后，抗人 IgG1 抗体与人 IgG1 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，若样品中存在人 IgG1，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，人 IgG1 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，即可计算出样品中人 IgG1 的浓度。

免疫球蛋白 G1 (IgG1)，是一种由两条γ1 重链与两条κ/λ轻链组成的 150 kDa 单体糖蛋白，占血清 IgG 总量约 60%，在体液免疫防御、治疗性抗体工程及免疫稳态维持中发挥核心作用。

IgG1 在多种疾病及治疗中扮演关键角色：①自身免疫病：IgG1 型自身抗体(抗 -dsDNA、抗 AChR) 通过补体与 FcγR 放大炎症，与 SLE、重症肌无力活动度正相关；②感染与疫苗：SARS-CoV-2 mRNA 疫苗诱导中和抗体 90%为 IgG1，高半乳糖糖型与保护效力正相关；③肿瘤免疫：抗 PD-1 (Pembrolizumab)、抗 HER2 (Trastuzumab) 等治疗单抗均基于 IgG1 骨架，FcγRIIIa-158V/F 多态性可预测 ADCC 依赖的临床获益；④免疫调节：高唾液酸 IgG1 (IVIG 富集) 上调抑制性 FcγRIIb，抑制关节炎模型炎症；FcRn 抑制剂 (Rozanolixizumab) 降低致病 IgG 水平，用于重症肌无力。



产品参数：

检测范围	0.78 ng/mL~50 ng/mL
敏感性	50 pg/mL
特异性	系统和其它因子无交叉反应
样本类型	人血清、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.稀释样品

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 500~5,000 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 50~500 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 0.78~50 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≤0.78 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. 重组人 IgG1 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 50 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 / 搅动以助溶解；

(2) 按下表将 50 ng/mL 标准品用样品稀释液进行倍比梯度稀释。(最高浓度为 50 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	50
B	300	300(从A管取出)	25
C	300	300(从B管取出)	12.5
D	300	300(从C管取出)	6.25
E	300	300(从D管取出)	3.125
F	300	300(从E管取出)	1.56
G	300	300(从F管取出)	0.78
H	300	0	0

注意：标准品复溶加样后，剩余部分请丢弃。

6. 准备生物素标记人 IgG1 抗体工作液 (需在使用前 1 h 内准备)

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

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

(3) 按1μL生物素标记人 IgG1 抗体添加99μL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 1 h 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℃或-20℃。

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(100μL/孔)分别加入相应孔中，用封板胶纸封住反应孔，37℃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人 IgG1 抗体工作液(100 μ L/孔),用封板胶纸封住反应孔,37℃孵育60min。

12.洗板5次,每孔1×洗涤液用量为300 μ L,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 μ L/孔),用封板胶纸封住反应孔,37℃避光孵育 30 min;

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℃反应 10~25 min。

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:

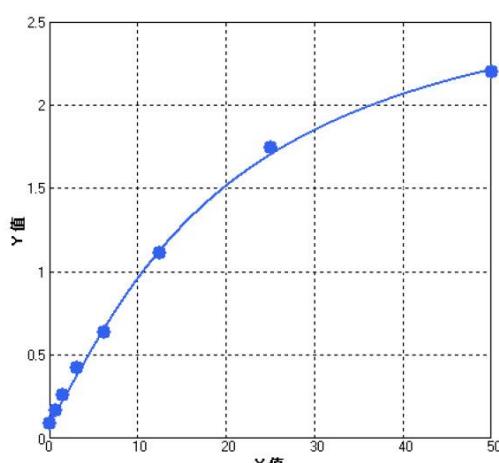
①复孔OD值在20%的差异范围内结果才有效,复孔OD值取平均后可作为测量值;

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

人 IgG1 参考标准曲线

标准品浓度	O.D.
0 ng/mL	0.091
0.78 ng/mL	0.168
1.56 ng/mL	0.260
3.12 ng/mL	0.419
6.25 ng/mL	0.637
12.5 ng/mL	1.109
25 ng/mL	1.745
50 ng/mL	2.200



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℃保存,自生产之日起6个月有效;长期储存请置于-20℃,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。

S251001

