仅供科研使用，不得用于临床检验。

睿信生物
RUIXIN BIOTECH

小鼠单克隆抗体 IgG 六种亚型鉴定试剂盒（特殊型）（ELISA）说明书

【产品名称】

通用名称：小鼠单克隆抗体 IgG 六种亚型鉴定试剂盒（特殊型）（ELISA）

【包装规格】

96 人份/盒

【预期用途】

仅供科研使用，定性检测血清、血浆、细胞培养上清液中小鼠单克隆抗体 IgG 六种亚型。

【检验原理】

本试剂盒利用双抗体夹心法鉴定小鼠淋巴细胞杂交瘤培养上清中单克隆抗体或特异亲和纯化单克隆抗体的类和亚类（可区分出 IgG1\IgG2a\IgG2b\IgG3\IgM\IgA）。采用小鼠抗体共有位点的二抗包被微孔板，与加入的培养上清中的小鼠抗体结合，再加入 HRP 标记的抗小鼠各类、亚类的抗体来分别反应，随后加底物 A 和 B，底物在 HRP 催化下，产生蓝色产物，在终止液（2M 硫酸）作用下，最终转化为黄色，在酶标仪上测定吸光度（OD 值），吸光度（OD 值）与小鼠单克隆抗体亚型的浓度呈正相关。

【主要组成成分】

主要成分

组分	数量	主要成分
微孔板	96T	小鼠二抗
通用阳性对照	0.6mL	/
通用阴性对照	0.6mL	/
样本稀释液	6mL	含 NBS 的 PBST
抗小鼠 IgA-HRP	2mL	HRP 标记的抗小鼠 IgA 抗体
抗小鼠 IgM-HRP	2mL	HRP 标记的抗小鼠 IgM 抗体
抗小鼠 IgG1-HRP	2mL	HRP 标记的抗小鼠 IgG1 抗体
抗小鼠 IgG2a-HRP	2mL	HRP 标记的抗小鼠 IgG2a 抗体
抗小鼠 IgG2b-HRP	2mL	HRP 标记的抗小鼠 IgG2b 抗体
抗小鼠 IgG3-HRP	2mL	HRP 标记的抗小鼠 IgG3 抗体
底物液 A	6mL	过氧化脲工作液
底物液 B	6mL	TMB 工作液
终止液	6mL	2mol/L 稀硫酸
20×浓缩洗涤液	30mL	含 0.15%Tween20 的 PBS
说明书	1 份	--
自封袋	1 个	--
不干胶	2 片	--

样本稀释液已经通过测试，结果表明 HBs 抗原阴性，HIV1、HIV2 和 HCV 抗体阴性，由于不存在一种试验方法能够完全保证没有这些物质，本品必须按照具有潜在的感染性进行处理，处理过程应当遵循通用的安全措施。

需要但未提供的材料及耗材

1、酶标仪

2、精密移液器及一次性吸头

3、蒸馏水

4、洗瓶或者自动洗板机

5、37℃水浴锅或恒温箱

6、500ml 量筒

7、无粉一次性乳胶手套

【储存条件及有效期】

1、2-8℃保存，切勿冷冻，有效期 6 个月。

2、开封使用后，包被微孔板放入带有干燥剂的自封袋中，密闭自封袋，并将全部试剂放回 2-8℃冰箱。

3、开封后，按照建议的条件保存，阴阳对照、包被微孔板和 HRP 标记抗体，有效期为 14 天，其他成分在标签标明的有效期内是稳定的。

【适用仪器】

半自动的酶标仪，如 Thermo MK3，或者国产酶标仪。

【样本要求】

样本类型和采集

以下只是列出样本采集的一般指南。所有样本采集过程中，不得使用叠氮钠做为防腐剂。

1、细胞培养上清：4000rpm 条件下离心 20min，去除细胞颗粒和聚合物，上清液保存在-20℃以下，避免反复冻融。

2、血清：使用不含热原和内毒素的试管，操作过程中避免任何细胞刺激，4000rpm 条件下离心 20min，小心地分离出血清，保存在- 20℃以下，避免反复冻融。

3、血浆：肝素，EDTA，或柠檬酸钠作为抗凝剂。在 4000rpm 条件下，离心 20 分钟取上清，血浆保存在-20℃以下，避免反复冻融。

样本保存和稳定性

样本在 2-8℃条件下，可以储存 72h，或者在- 20℃储存 6 个月。样本收集后，不是一次检测完，请按一次用量分装冻存，避免反复冻融，使用时在室温下解冻，确保样品均匀充分解冻。

【检验方法】

试剂准备

1、使用前，所有的组分都要至少复温 120min，确保充分复温到室温。

2、浓缩洗涤液：从冰箱取出的浓缩洗涤液，会有结晶产生，这属于正常现象，水浴加热使结晶完全溶解。浓缩洗涤液与蒸馏水，按 1:20 稀释，即 1 份的浓缩洗涤液，添加 19 份的蒸馏水。

3、底物：底物液 A 和 B，在使用前，按 1:1 体积充分混合，混合后 15 分钟内使用。

操作程序

1、首先将试剂盒恢复室温，然后用纯水把洗涤液配成工作浓度（一份浓缩洗涤液加 19 份纯水）。

2、取出酶标板。每个样本需要 6 孔，阳性对照 6 孔，阴性对照 6 孔。多余的用自封袋保存，记得放入干燥剂。

3、将样本检测孔每孔先加入样本稀释液各 50μl。然后将 50μl 细胞培养上清（或特异亲和纯化的抗体）再加入酶标微孔板，每个样本加 6 孔；阳性对照和阴性对照各 6 孔每孔 100μl 此处不加样本稀释液。贴上封板膜 37℃温育 30 分钟。

4、弃去板内液体，手工洗板 5 遍后在不掉纤维的吸水材料上拍干（或机洗 5 遍）。再在每个样本的 6 孔中分别加入 6 种酶标二抗各 100μl，通用阳性、阴性对照的各孔也一样。在加样图上或酶标板上做好标记。贴上封板膜 37℃温育 30 分钟。

5、弃去板内液体，手工洗板 5 遍后在不掉纤维的吸水材料上拍干（或机洗 5 遍）。每孔加入底物液 A、B 混合物 100μl，换一张新的封板膜贴板避光 37℃显色 20 分钟。

6、本试剂盒特异性好，一般肉眼即可观察出结果，看显色蓝的那个孔所对应的酶标二抗就知道此样本的 Ig 类或亚类。更可将反应终止液（每孔 50μl）终止反应后用酶标仪 450nm 测定波长，参看高值孔所对应的酶标二抗就知道此样本的 Ig 类或亚类。

【检验结果的解释】

阳性对照 OD 一般不小于 0.8，阴性对照一般不高于 0.15

1、Cut-Off 值设定：阴性对照 OD 值+0.15，做为阈值。

2、样本 OD 值大于 Cut-Off 值，判定为阳性。

样本 OD 值小于等于 Cut-Off 值，判定为阴性。

3、建议阳性样本，要再测下抗体滴度。

【检验方法的局限性】

1、仅供科研使用，不得用于临床诊断。

2、在试剂盒标示的有效期内使用，过期产品不得使用。

3、跟其他厂家的试剂盒或者组分不能混用。

4、使用试剂盒配套的样品稀释液。

5、如果样本值高于阳性对照 OD 值，请将样本适当稀释后，再重新测定。

6、通过其他方法得到的检测结果，与本试剂盒测定结果不具有直接的可比性。

【产品性能指标】

1、物理性能

试剂盒的各液体组分应澄清透明、无沉淀或者絮状物。微孔板铝箔袋应真空包装，无破损漏气。

2、精密度

批内精密度：三组已知的高、中、低浓度样品，进行二十次在同一个板块内精度评估。批内变异系数 CV%小于 10%。

批间精密度：三组已知的高、中、低浓度样品，进行二十次在不同板块内精度评估。批间变异系数 CV%小于 15%。

3、稳定性

2℃-8℃保存，有效期 6 个月。

【注意事项】

<u>生物安全</u>

1、检测必须符合实验室管理规范的规定，严格防止交叉污染，所有样品、洗弃液和各种废弃物都应按照传染物进行处置。

2、试剂盒的液体组分中，含有 proclin-300 防腐剂，可能引起皮肤过敏反应，避免吸入烟雾与皮肤接触。

3、底物液对皮肤、眼睛和上呼吸道有刺激作用，避免吸入烟雾。戴上防护手套，实验完成后彻底洗手。

<u>技术提示</u>

1、混合蛋白溶液时，避免起泡。

2、加阴阳对照与样本时，每个阴阳对照和样本都要更换移液枪头，公共组分应该悬臂加样，避免交叉污染。

3、合适的温育时间，和充分的洗涤步骤，是保证实验结果准确性的必要条件。

4、底物溶液为无色液体，保存过程中变为蓝色，代表底物溶液已经失效，不得使用。

5、终止液加样顺序与底物溶液加样顺序一致，加入终止液后，蓝色底物产物，会瞬间变为黄色。

6、实验中，用剩的板条，应立即放回自封袋中，密封（低温干燥）保存。

7、所有液体组分，使用前充分摇匀，严格按照说明书标明的时间、加样量及加样顺序进行温育操作。

废物处理

所有使用或未使用的试剂，所有污染性的一次性材料，应当遵循传染性或潜在传染性产品的处理程序，每个实验室都有责任根据其实验的类型和危险性级别，进行废物和污物的处理，同时要严格依照有关规定对待所有的废物和污物。