

仅供科研使用，不得用于临床检验。

小鼠单克隆抗体 Ig 类/亚类鉴定试剂盒（ELISA）

说明书

【产品名称】

通用名称：小鼠单克隆抗体 Ig 类/亚类鉴定试剂盒（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 Ig 类/亚类。

【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	0.35mL	PBS
通用阴性对照	0.35mL	酪蛋白
样品稀释液	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	25mL	含 0.15%Tween20 的 PBS
说明书	1 份	--
自封袋	1 个	--
不干胶	2 片	--

酶标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

仅供科研使用，不得用于临床诊断。

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，校准品、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

以下只是列出样品采集的一般指南。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（大约 30 分），然后用纯水把清洗液配成工作浓度（一份浓缩清洗液加 19 份纯水）。

2、取出酶标板。每个标本需要 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、将标本检测孔每孔先加入标本稀释液各 50 μ l。然后将 50 μ l 细胞培养上清（或特异亲和纯化的抗体）再加入酶标微孔板，每个标本加 6 孔；阳性对照和阴性对照各 6 孔每孔 100 μ l 此处不加标本稀释液。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）。再在每个标本的 6 孔中分别加入 6 种 酶标二抗各 100 μ l，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、吸弃板内液体，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）。每孔分别加入显色剂 A 和显色剂 B 各 50 μ l，换一张新的封板膜贴板避光 37℃显色 20 分钟。

二、实验操作

1、所有试剂和组分都先恢复到室温。

2、按前面试剂准备中描述的方法，配制好试剂盒各种组分的工作液。

3、从自封袋中取出所需板条，剩余的板条用自封袋密封放回冰箱。

4、设置样本孔、阴性对照孔和空白孔，样本孔加待测样本 50 μ L，阴性对照孔加酶标稀释液 50 μ L，空白孔不加，用封板膜盖住反应板，37℃水浴锅或恒温箱温育 30min。

5、揭开封板膜，弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液，静置 20s，甩去洗涤液，吸水纸上拍干。如此重复 4 次（共洗板 5 次）。若使用自动洗板机，请按洗板机操作程序进行洗板，添加浸泡 20s 的程序，可以提高检测的精度。洗板结束，加底物前，要在干净不掉屑的纸上，充分拍干反应板。

6、除空白孔外，阴性对照孔和样本孔，加入辣根过氧化物酶标记的检测抗体 100 μ L。

7、用封板膜盖住反应板，37℃水浴锅或恒温箱温育 30min。

8、揭开封板膜，弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液，静置 20s，甩去洗涤液，

仅供科研使用，不得用于临床诊断。

吸水纸上拍干。如此重复 4 次（共洗板 5 次）。若使用自动洗板机，请按洗板机操作程序进行洗板，添加浸泡 20s 的程序，可以提高检测的精度。洗板结束，加底物前，要在干净不掉屑的纸上，充分拍干反应板。

9、将底物 A 和 B 按 1:1 体积充分混合，所有孔中加入底物混合液 100 μ L。用封板膜盖住反应板，37℃水浴锅或恒温箱温育 15min。

10、所有孔加入终止液 50 μ L，在酶标仪上读取各孔吸光度（OD 值）。

【检验结果的解释】

1、Cut-Off 值设定：阴性对照 OD 值+0.35，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、如果样本值高于最高标准品浓度值，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。

仅供科研使用，不得用于临床诊断。

【注意事项】

生物安全

- 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。

技术提示

- 1、混合蛋白溶液时，避免起泡。
- 2、加校准品与样本时，每个校准品浓度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。