



EK279-02

Mouse Ig Isotyping ELISA Kit 检测试剂盒（酶联免疫吸附法）

Catalog Number

EK279 - 48

EK279 - 96

定性测定杂交瘤细胞培养上清液、腹水和纯化抗体中的小鼠免疫球蛋白亚型。

本产品仅用于科学研究，非诊断试剂，不能用于临床诊断。

一、产品介绍

1. 背景介绍

抗体分型对杂交瘤细胞制备非常关键、有用。本试剂盒可鉴定小鼠中的 6 种免疫球蛋白重链亚型和 2 种轻链亚型，分别是 IgA、IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、 κ 链和 λ 链。可准确、特异性地鉴定杂交瘤细胞所产生的重链和轻链类型，并鉴定是否是单克隆抗体。因此本试剂盒是区分鉴定每个潜在克隆的非常有用的工具。

由于各种亚型的化学和生物特性有所不同，对其进行鉴定是必不可少的。它们在溶解性、电泳特性、对裂解酶的敏感性以及与蛋白 A 的反应性等方面具有差异。因此鉴定单克隆抗体的类别和亚类对于选择最佳的免疫球蛋白纯化方式非常有用。例如通过分子量大小(如凝胶层析)或免疫亲和分离柱纯化小鼠 IgA 和 IgM 是最好的方法。小鼠 IgG2a 和 IgG2b 可在 pH 7 - 8 的条件下，通过固相蛋白 A 进行纯化，而小鼠 IgG1 可在 pH 8 - 9 的条件下，通过固相蛋白 A 进行纯化。 κ 链的免疫球蛋白可通过固相的蛋白L 进行纯化。

2. 检测原理

本试剂盒采用双抗体夹心酶联免疫吸附检测技术定性鉴定。特异性抗小鼠免疫球蛋白亚型的单克隆抗体预包被在高亲和力的酶标板上。酶标板孔中加入待测样本、阳性对照和辣根过氧化物酶偶联的检测抗体，经过孵育，样本中存在的免疫球蛋白与固相抗体和检测抗体结合。洗涤去除未结合的物质后，加入显色底物 TMB，避光显色。加入终止液终止反应，在 450 nm 波长(参考波长 570 - 630 nm)测定吸光度值。

3. 试剂盒检测的局限

- 1) 请在本试剂盒标示的有效期内使用。
- 2) 试剂盒的试剂不能与其他批号的试剂或其他来源的试剂混合使用。
- 3) 任何标准品稀释、操作人员、移液技术、洗涤技术、孵育温度、试剂盒保存时间的改变，都将影响结合反应。
- 4) 本试剂盒在设计上去除或降低了生物学样本中的一些内源性干扰因素，并非所有可能的影响因素都已经去除。

二、基本信息

1. 试剂盒提供的材料

组分	编号	EK279 - 48	EK279 - 96
预包被酶标板	EK279P	48T	96T
检测抗体	EK279D	1 vial	1 vial
阳性对照	EK279PC	1 vial	2 vials
10×检测缓冲液	E0310	5 ml	5 ml
显色底物 TMB	E0230	6 ml	11 ml
终止液	E0300	11 ml	11 ml
20×洗液	E0281	50 ml	50 ml
封板膜	E0200	6	6

2. 未提供的材料设备

- 1) 能够检测 450 nm 吸光度的酶标仪，参考波长 570 nm 或 630 nm
- 2) 移液器及枪头、加样槽
- 3) 准备试剂用的试管、离心管、量筒等
- 4) 蒸馏水或去离子水
- 5) 涡旋振荡器、微孔板振荡器

3. 贮存

试剂盒保存于 2 - 8℃，有效期标注于标签上。只有恰当保存的试剂才是有保证的。如果试剂盒的组分需要再次使用，请确保上一次使用之后没有被污染。

未开封试剂盒		贮存于 2 - 8℃。 请在有效期内使用。
打 开 的 试 剂 盒 或 重 组 试 剂	1×洗液 1×检测缓冲液 终止液 显色底物 TMB 检测抗体	在 2 - 8℃， 大约可以贮存 1 个月。
	阳性对照	在-20℃，大约可贮存 1 个月。 重溶使用1次后丢弃。
	预包被酶标板	未使用的板条请放回铝箔袋，封好封 口。在 2 - 8℃，大约可贮存 1 个月。

4. 注意事项

- 1) 所有的化学试剂理应被认为具有潜在危害。
- 2) 推荐只有经过良好实验室培训的工作人员方可操作本试剂盒。操作时请佩戴合适的防护设施，例如白大衣、乳胶手套、安全眼镜等。
- 3) 请避免试剂接触皮肤和眼睛。如不慎接触，请立即用大量清水清洗。
- 4) 试剂盒中的终止液为酸性溶液，在使用终止液时，请佩戴防护服，及防护眼睛、手及面部的设施。
- 5) 本试剂盒用于科学研究，不能用于诊断治疗。
- 6) 请不要使用其他批号或其他来源的试剂替代本试剂盒中的试剂。
- 7) 请不要使用过期的试剂。
- 8) 在试剂盒的贮存或孵育过程请避免强光照射。
- 9) 在操作试剂盒或处理样本的区域请不要饮食。
- 10) 不要让试剂或样本接触皮肤和粘膜。
- 11) 在操作试剂盒或处理样本时请佩戴乳胶或一次性手套。
- 12) 显色底物避免与氧化试剂和金属接触。
- 13) 避免气溶胶的产生。
- 14) 为了避免微生物的污染，以及试剂与样本间的交叉污染，请使用一次性枪头。

- 15) 使用干净的容器配制试剂。
- 16) 暴露于酸性环境会抑制结合。
- 17) 试剂的准备必须使用蒸馏水或去离子水。
- 18) 显色底物在使用之前必须平衡至室温 ($25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$)。
- 19) 样本可能含有传染性病原体, 处理样本和可能的污染材料的首选方法是 121.5°C , 最少 1 小时。
- 20) 液体废弃物的处理。不含酸的液体废弃物, 加入 1.0% 的次氯酸钠, 浸泡 30 分钟。含酸的液体废弃物, 请先中和, 再加入次氯酸钠。

5. 技术要点

- 1) 重溶或者混合蛋白的时候, 始终避免气泡产生。
- 2) 避免交叉污染, 在进行标准品加样、样本加样, 以及不同试剂加样的时候, 请更换枪头。不同的试剂, 使用不同的加样槽。
- 3) 在应用自动洗板机时, 加入洗液之后, 设置 30 秒的浸泡程序, 或者在不同的洗涤步骤将微孔板掉转 180 度, 这样可以提高分析的准确度。
- 4) 为保证结果的精确性, 孵育时封好封板膜。
- 5) 显色底物在添加之前应是无色的。保持显色底物始终处于避光态。
- 6) 终止液的添加顺序应与显色底物的添加顺序相同。
- 7) 添加终止液之后, 底物的颜色应由蓝色转变为黄色。如果底物呈现绿色, 说明终止液与显色底物没有充分混匀。
- 8) 推荐所有的检测样本和标准品在检测中设复孔。
- 9) 在任何情况下, 避免接触微孔板的内表面。

三、 检测步骤

1. 样本采集与贮存

细胞培养上清

300 × g 离心 10 分钟去除沉淀物, 即刻检测, 或者分装, -20°C 以下贮存。

注意: 检测前, 样本中可见的沉淀必须去除。不要使用严重溶血或高血脂的样本。样本应分装并贮存于 -20°C , 以避免小鼠 Ig (H+L) 活性的丢失。如果在 24 小时内检测。样本可以存放在 $2 - 8^{\circ}\text{C}$ 。

避免样本的反复冻融。在检测前, 冷冻样本应缓慢地恢复至室温 ($25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$), 轻柔地混匀。

2. 试剂准备

检测前请将所有的试剂、样本恢复至室温 ($25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$)。

如果浓缩的试剂出现结晶, 37°C 温浴, 直至结晶全部溶解。

1×洗液

吸取 20×浓缩洗液 50 ml 至 1 L 的量筒, 加蒸馏水至 1,000 ml, 轻轻混匀, 避免泡沫。转移至干净瓶内。2 - 25°C 贮存, 1×洗液可稳定保存 30 天。

1×检测缓冲液

吸取 10×浓缩检测缓冲液 5 ml 至 100 ml 量筒, 加蒸馏水至 50 ml, 轻轻混匀, 避免泡沫。2 - 8°C 贮存, 1×检测缓冲液可稳定保存 30 天。

检测抗体

稀释前充分混匀。根据标准品和待检样本的数量, 用 1×检测缓冲液按 **1: 100** 稀释浓缩的检测抗体。

注意: 请在 30 分钟内使用稀释后的检测抗体。

样本稀释

为了保证实验成功, 由于对样本的处理方式, 培养条件等不同, 建议首次使用本试剂盒前先进行一次预实验以摸索最佳的样本浓度, 避免因浓度过高使显色反应超出酶标仪的检测上限或稀释倍数过大低于试剂盒灵敏度。对于样本的稀释, 请用试剂盒提供的 1×检测缓冲液稀释细胞培养上清、腹水和纯化的抗体。

小鼠 Ig 阳性对照

用蒸馏水或去离子水重溶小鼠 Ig 阳性对照, 重溶体积标注在小鼠 Ig 阳性对照的标签上。轻柔地涡旋震荡, 确保充分混匀。重溶后静置 10 - 30 分钟。

3. 检测步骤

检测之前请将所有的试剂、样本平衡至室温 ($25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$)。

- 1) 准备好所有需要的试剂及工作浓度标准品。
- 2) 将不需要的板条拆卸下来, 放回装有干燥剂的铝箔袋, 重新封好封口。
- 3) **浸泡酶标板:** 加入 300 μl 1×洗液静置浸泡 30 秒。为了获得理想的实验结果浸泡是必须的。弃掉洗液之后, 在吸水纸上将微孔板拍干。洗板完成之后, 请立即使用微孔板, 不要让微孔板干燥。

加阴/阳性对照：在酶标板第一列的每孔加入 100 μ l 阳性对照。在酶标板第二列的每孔加入 100 μ l 1 \times 检测缓冲液作为阴性对照。

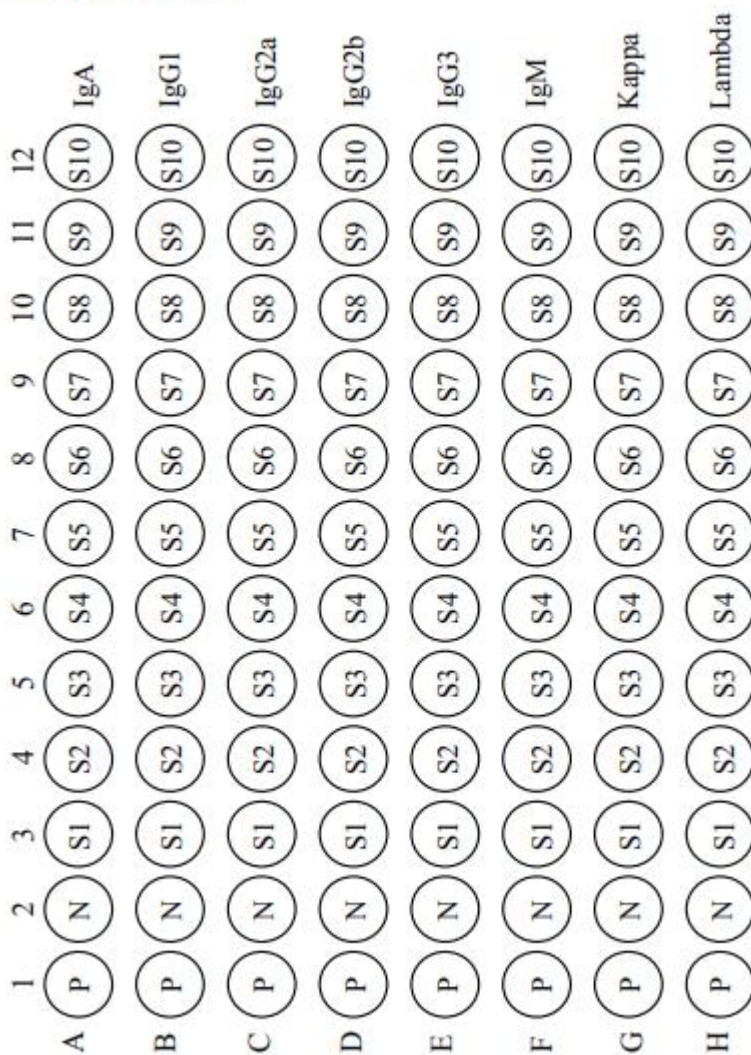
- 4) **加样本：**每一列的样本孔加入 100 μ l 经适当稀释的样本。
- 5) **加检测抗体：**每孔加入50 μ l 稀释的检测抗体(**1:100 稀释**)。保证步骤 4、5、6 连续加样，不要间断。加样过程在 15 分钟内完成。
- 6) **孵育：**使用封板膜封板。100-300转/分钟振荡（保证每孔溶液不撒出且能充分混匀即可），室温（25 $^{\circ}$ C \pm 3 $^{\circ}$ C）孵育 2 小时。
- 7) **洗涤：**弃掉液体，每孔加入 300 μ l 洗液洗板，洗涤 6 次。每次洗板，在吸水纸上拍干。为获得理想的实验性能，必须彻底移除残留液体。
- 8) **加底物显色：**每孔加入 100 μ l 显色底物 TMB，避光，室温（25 $^{\circ}$ C \pm 3 $^{\circ}$ C）孵育 5 - 30 分钟。
- 9) **加终止液：**每孔加入 100 μ l 终止液。颜色由蓝色变为黄色。如果颜色呈现绿色或者颜色的变化明显不均匀，请轻轻叩击板框，充分混匀。
- 10) **检测读数：**在 30 分钟之内，使用酶标仪进行双波长检测，测定 450 nm 最大吸收波长和 570 nm 或 630 nm 参考波长下的 OD 值。校准后的 OD 值为 450 nm 的测定值减去 570 nm 或 630 nm 的测定值。仅使用 450 nm 测定会导致 OD 值偏高，并且准确度降低。

4. 检测步骤概要

- 1) 准备所有的试剂和阴性对照。板条加入300 μ l 1 \times 洗液静置浸泡30秒。
- 2) 第一列的每孔加入 100 μ l **阳性对照**。
第二列的每孔加入 100 μ l 1 \times 检测缓冲液作为**阴性对照**。
- 3) 每一列的样本孔加入 100 μ l 经适当稀释的**样本**。
- 4) 每孔加入 50 μ l **1:100 稀释的检测抗体**。步骤 2、3、4 在 15 分钟内完成。
- 5) 封膜，室温（25 $^{\circ}$ C \pm 3 $^{\circ}$ C）孵育 2 小时。
- 6) 洗涤 6 次。
- 7) 每孔加入 100 μ l **显色底物**，避光，室温（25 $^{\circ}$ C \pm 3 $^{\circ}$ C）孵育 5 - 30 分钟。
- 8) 每孔加入 100 μ l **终止液**。
- 9) 30 分钟内，在 450 nm 波长检测 OD 值，参考波长 570 nm 或 630 nm。

5. 排版布局

PLATE LAYOUT



P: Positive control N: Negative control S1-S10: Sample 1 – Sample 10

更多资讯和支持请关注联科生物公众号

