



人体免疫球蛋白 G (IgG) 酶联反应试剂盒

含 1 个平板 产品目录编号# AB000303

此试剂盒包含检测人体血清和生物样品的人体免疫球蛋白 G (IgG) 水平所需的全部组分。

请在操作之前仔细阅读此说明书。

本试剂盒只能用于科学研究，不能用于医学诊断。

实验原理

人体免疫球蛋白G (IgG) 酶联反应试剂盒是用来定量测量人体血清和生物样本中的人体IgG。在实验开始之前请仔细阅读此说明。用不同浓度的人体IgG标准品制作一条标准曲线，然后再根据标准曲线来读出未知样品中IgG的含量。将人体IgG标准品或者稀释的未知样品加入已包被好抗人体IgG抗体（结合测试样品中的IgG分子）的96孔平板中。接下来反应一段时间让平板上的抗体结合样品中的IgG分子，然后加入生物素标记的抗人体IgG抗体，经过反应并连接到与平板的抗体结合的IgG蛋白上。经过一小时的反应，冲洗平板并加入链霉亲合素-辣根过氧化物酶(Horse Radish Peroxidase)复合物,反应45分钟。链霉亲合素-辣根过氧化物酶可以与平板上任何带生物素标记的抗体结合。冲洗平板以去除未结合的链霉亲合素-辣根过氧化物酶，加入TMB底物，在辣根过氧化物酶的作用下会按照结合在平板上的IgG的数量成比例的产生有颜色的产物。经过一段时间会产生颜色反应，终止反应并用能读取450nm波长的分光光度计测量生成的颜色的强度。通过提供的IgG的标准品生成一条标准曲线，在考虑样品适当的稀释倍数下，计算出未知样品中IgG蛋白的浓度。

检测盒提供的组分

1. 已包被的96孔平板

一个包被了兔抗人体IgG抗体的平板。

检测盒AB-000303（一个平板）

2. 人体IgG标准品

用一种特殊的稀释液将人体IgG标准品稀释为六个浓度，从1.1 ng/ml到270 ng/ml（100ul/孔，三个重复）。

检测盒AB-000303（6管，不同浓度，400ul/管）

3. 五倍浓缩的稀释液

用来稀释抗体和链霉素-辣根过氧化物酶。将15ml溶液用60ml无离子水或蒸馏水稀释到75ml。

检测盒AB-000303（15ml）

4. 十倍浓缩的磷酸缓冲液（10x PBS-T）

稀释后用做洗脱液（含0.1% Tween-20磷酸缓冲液），用30ml溶液加入270ml无离子水或蒸馏水稀释到300ml。

检测盒AB-000303（30ml）

5. 报告抗体

能够特异性结合人体IgG分子的生物素标记的兔多克隆抗体。实验之前，将150ul溶液添加到15ml一倍浓度的稀释液中配成2.5ug/ml的溶液待用。

检测盒AB-000303（1 mg / ml, 150 μ l / 管）

6. 链霉亲合素-辣根过氧化物酶复合物（Streptavidin-HRP Conjugate）

在一种特殊稳定剂中的链霉亲合素-辣根过氧化物酶复合物。

用稀释液（15ml）将4 µg/ml的母液稀释40倍至0.1 µg /ml，然后使用。

检测盒AB-000303（4 µg / ml，375 µl / 管）

7.TMB底物 (TMB Substrate)

检测盒AB-000303 (15 ml)，直接使用。

8.终止反应试剂 (Stop Solution)

1 mol/l 硫酸（腐蚀性!）

检测盒AB-000303 (15 ml)，直接使用。

9.平板覆盖膜（Plate Sealer）

检测盒AB-000303（一张）

其他需要的材料：

①去离子水

②可在5-250 µl间进行体积调整的单通道或多通道移液枪

③塑料试管（如1.5 ml离心管），用于稀释样品

④添加液体时需要用的加样槽

⑤能用于读450 nm光波吸收的酶标仪

⑥能进行四参数曲线拟合（four parameter logistic curve）的软件（也可以用 Microsoft Excel 制图）

特别提示

1. 像其他类似的产品一样，本检测盒仅供有实验室安全常识的专业技术人员使用。在使用此产品之前，请需要仔细阅读产品说明书。

2. 本试剂盒是以过氧化物酶反应为基础的系统。如果用其它厂家的洗脱液，要确定溶液中不包含叠氮化合物（Azide），因为叠氮化合物会抑制过氧化物酶的活性。在用我们提供的洗脱液（见第2页PBS-T缓冲液）前，应确保配制洗脱液的所有容器都用去离子水洗过。

3. 终止试剂是酸性的，操作过程中需要格外注意，防止与皮肤和眼睛接触。

实验过程中的注意事项

1. 在实验开始之前把稀释过的试剂和缓冲液平衡到室温（18-25°C）。一旦实验开始，所有的步骤都应按顺序进行不可以中断。在各步实验进行之间要确保平板不能干掉，因为这样容易引起过高的基准线或是错误结果。要确保在操作前，所需的材料和试剂都已准备好。试剂加入平板后，需要轻轻摇晃混匀，不能剧烈震动。

2. 为了避免试剂、移液枪头和平板的交叉污染，应使用一次性的移液枪头和试剂容器。未用完的试剂不要重新倒回试剂瓶或试剂管中，注意不要把不同试剂瓶的盖子弄混而造成交叉污染。

3. 不同的反应时间会影响实验结果。在平板上每一步操作中加入试剂的孔的位置都要保持一致，每一步操作都应按照说明书进行。

4. 平板的冲洗十分重要，这一步可以影响到结果的准确性或产生较高的背景信号。建议每孔加入250 μ l洗脱液来冲洗平板，接下来控干平板也需要快速操作。需要用吸水纸来尽可能的将平板中的液体吸干。冲洗时应避免静置时间太长。

5. 当添加试剂到平板中的时候，要避免破坏已经包被过的孔壁，例如，移液枪头触碰到底部或者一侧的孔壁。有一种操作方式可以避免此类情况的发生，当加样时（右手操作的人员）可以按照从左到右的顺序，让移液器的枪头每次都在孔的右侧边缘加样，这样可以避免触碰到孔的壁和底部。

6. 当反应进行的时候，要尽可能减少平板的蒸发。可以用附带的覆盖膜覆盖平板或用一个空的平板置于反应平板之上。

7. 在完成最后一次洗板操作，加入TMB底物之前，用干净的纸巾轻轻擦拭平板的底部以避免平板底部的灰尘和指痕影响OD值的准确读取。

8. 一旦加入TMB底物，平板中的过氧化酶（HRP）就会催化其转化为蓝色物质。通常情况下，10-15分钟的反应时间就可以让颜色反应达到理想状态，此时反应应当终止。切

记，如果反应时间充足，即使是少量的过氧化物酶（HRP）都可以把TMB底物转化成产物。如果这样的话，就很难区分不同样品之间的差异。应设法使450 nm的吸光度（OD值）低于2.0，这样可以得出最准确的结果。OD值过高会影响测定的准确性，因为如果OD值是1.0，表明有10%的光被检测到，而OD值是2.0，则表明只有1%的光被检测到。

样品预处理建议

当你连续稀释含有IgG的样品时，推荐你每稀释一次就更换一个枪头，而不是用同一个枪头进行所有的稀释。关于人类血清样品我们已经有很好的结果，将样品稀释一百万倍后的酶联反应试验测得OD值为1。

实验步骤

1.请按后面所附的平板示意图来规划待测样品加入的位置，这有利于在数据分析时确定标准品和待测样品的相应位置。我们推荐一个样品两次重复或者三次重复（最优）以减少误差。

2.将十倍的磷酸缓冲液(10x PBS-T)和五倍的稀释液(5x Dilution buffer)用水稀释成一倍溶液。在开始之前检查浓缩液组分是否有沉淀，如果有沉淀在用之前用温水浴略微加热。将30ml十倍的磷酸缓冲液用270ml水稀释到300ml，五倍的稀释液用60ml水稀释到75ml。

3.用一倍的稀释液将你的样品稀释，最佳方案是连续稀释到一个较宽的范围，例如我们将样品多倍稀释到0.1 – 300ng/ml之间。用移液枪吸取100ul样品或标准品加入到平板上。保留几个没加样品的孔作为空白对照。覆盖平板并在室温下反应1.5小时。

4.在上述实验反应过程中，将1mg/ml的报告抗体用15ml一倍的稀释液稀释到10ul/ml。

5.控干平板并用250ul的洗脱液清洗每个孔。再次控干平板并将平板倒置在吸水纸上，尽量让吸水纸将孔内液体吸尽。重复两次。

- 6.每孔加入 100ul 的报告抗体。覆盖平板在室温下反应 45 分钟。
- 7.在上述反应进行中是，将4ug/ml总量375ul的链霉亲合素-辣根过氧化物酶用15ml一倍的稀释液稀释到0.1ug/ml。
- 8.控干平板，每孔加入250 μ l的洗脱液。再次控干平板并将平板倒置在吸水纸上，重复两次。
- 9.每孔加入**100** μ l稀释好的链霉亲合素-辣根过氧化物酶复合物。覆盖平板，室温下反应30分钟。
- 10.控干平板，每孔加入250 μ l的洗脱液。再次控干平板并将平板倒置在吸水纸上，重复两次
- 11.每孔加入**100** μ l TMB底物，待颜色反应稳定后，每孔加入终止试剂**100** μ l终止反应并保持颜色稳定。通常反应10-15分钟。
- 12.用酶标仪在**450** nm波长下读取平板的数据。用三个孔作为空白对照，例如H10-H12。
- 13.用酶标仪的自带软件（通常是四参数曲线拟合，four parameter logistic curve）或座标纸作出IgG的标准样品曲线，并由此计算出待测样品中的IgG的含量。

结果分析与计算

标准蛋白、待测样品和空白对照均做三个重复，并取其平均值。从标准蛋白和待测样品的平均值中减去空白对照的平均值得到净值。用对数作图纸或作图软件（4参数校正）制备标准曲线，由此推算出样品中IgG的浓度。请注意把样品的稀释倍数考虑在内。

数据分析

样品	测量 OD	[IgG]
NSB (0ng/ml IgG)	0.370	0
1.1 ng/ml 人体 IgG	0.433	1.2
3.3 ng/ml 人体 IgG	0.598	3.1
10 ng/ml 人体 IgG	1.093	10.2
30 ng/ml 人体 IgG	1.828	30.7
90 ng/ml 人体 IgG	2.479	92.2
270ng/ml 人体 IgG	2.822	324
未知 1	0.686	3.5
未知 2	2.280	69
未知 3	2.72	234

	1										
	2										
	3										
	4										
	5										
	6										
	7										
	8										
	9										
	10										
	11										
	12										
A											
B											
C											
D											
E											
F											
G											
H											