

Speedy™ 人/食蟹猴IgG一步法ELISA检测试剂盒

请在实验前仔细阅读本说明书

产品货号: SE50326

规格: 96T

灵敏度: 0.02 ng/mL

检测范围: 0.156-10 ng/mL

用途: 此试剂盒用于定量检测血清、血浆、尿液、唾液以及母乳中的人/食蟹猴IgG浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

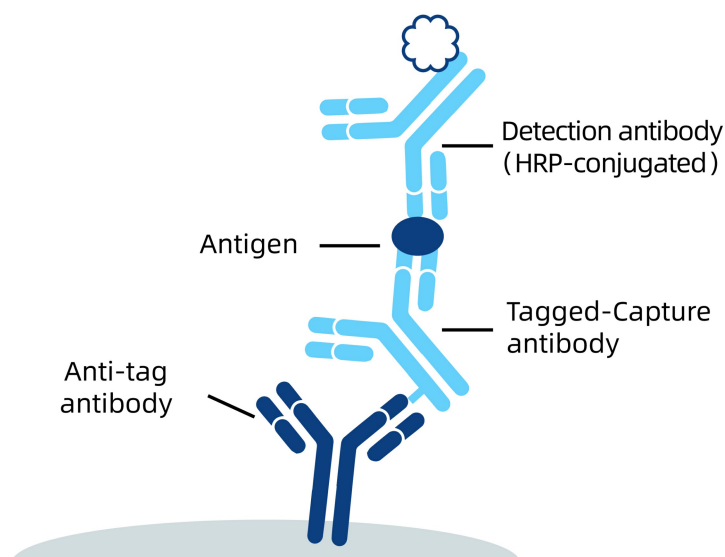
目录

- 一：背景信息 3
- 二：检测原理 3
- 三：需自备的实验器材 3
- 四：试剂盒组分及储存 4
- 五：实验注意事项 4
- 六：样本准备 4
- 七：试剂准备 5
- 八：实验步骤 6
- 九：实验参数 7
 - 9.1 参考标曲图 7
 - 9.2 精密度 8
 - 9.3 加标回收率 8
 - 9.4 样本值 9
 - 9.5 灵敏度 9
 - 9.6 线性 9
 - 9.7 特异性 10
- 十：参考文献 10

一：背景信息

免疫球蛋白G (IgG) 是人体血清中含量最丰富的抗体亚型。它是一种由两条相同的重链和两条相同的轻链组成的单体糖蛋白，分子量约为150 kDa。IgG通过介导病原体中和、吞噬作用和补体激活，在适应性免疫中发挥着核心作用。其四个亚类 (IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4) 具有不同的功能特征和对 Fc 受体的亲和力差异，从而能够产生针对性的免疫应答。值得注意的是，IgG 是唯一能够穿过胎盘屏障的抗体类，从而为新生儿提供被动免疫。

二：检测原理



抗标签抗体预先包被于板孔，可结合带标签的捕获抗体。抗原或样本、捕获抗体及辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的检测抗体加入后，在溶液中形成夹心复合物。在HRP催化下，四甲基联苯胺 (TMB) 使底物溶液由无色变蓝，加入终止液后变黄。溶液颜色深浅与结合蛋白量成正比。测量波长为450 nm，校正波长为630 nm。

三：需自备的实验器材

- 3.1 酶标仪（可读取450nm和630nm双波长）；
- 3.2 高精度移液器及一次性移液器枪头；
- 3.3 洗板机（亦可手动洗板）；
- 3.4 EP管（用于稀释标准品及样本）；
- 3.5 吸水毛巾或滤纸（用于拍干）；
- 3.6 烧杯和量筒；
- 3.7 用于ELISA实验的数据分析的统计拟合软件（推荐四参数拟合方法），如：Origin，ELISA Calc等，也可使用Proteintech 公司数据分析网站：<https://www.ptgcn.com/products/elisa-kits/>；
- 3.8 微孔板恒温振荡器。

四：试剂盒组分及储存

英文名称	中文名称	规格	数量
Microplate	预包被酶标板 - 96 孔板	8孔 × 12条	1 块
Protein standard	标准品 - 冻干粉状 *	20 ng/瓶	2 瓶
Capture Antibody (100×)	捕获抗体浓缩液 (100×) **	60 uL/管	1 管
Detection antibody, HRP-Conjugated (100×)	HRP标记检测抗体浓缩液 (100×) **	60 uL/管	1 管
Sample Diluent PT 4B1	样本稀释液 PT 4B1	30 mL/瓶	3 瓶
Detection Diluent PT PB1	抗体稀释液 PT PB1	15 mL/瓶	1 瓶
Wash Buffer Concentrate (20×)	浓缩洗涤液 (20×)	30 mL/瓶	1 瓶
Tetramethylbenzidine Substrate (TMB)	显色底物 TMB	12 mL/瓶	1 瓶
Stop Solution	终止液	12 mL/瓶	1 瓶
Plate Cover Seals	封板膜		4张
储存条件： 1：未开启试剂盒可在2-8℃条件下存放6个月或者在-20℃条件下存放1年 2：已开启试剂盒可在2-8℃存放7天 3：每次实验均使用新的标准品,使用后丢弃			

* 使用对应的样本稀释液对标准品进行复溶，详见7.4部分，复溶过程避免产生气泡

** 开盖前请离心

五：实验注意事项

5.1 避免皮肤接触终止液以及TMB 显色液；

5.2 在实验过程中，注意穿戴个人防护装备，如实验服，手套，口罩和护目镜；

5.3 请勿将不同批次的试剂进行混用，过期产品请勿使用；

5.4 在使用自动洗板机时，板孔加入洗涤液之后，设置30秒的浸泡程序，以提高分析的精确度。

六：样本准备

6.1 血清：全血标本室温凝固 30 min后1000×g 离心15 min，取上清立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融。

6.2 血浆：可用EDTA、肝素或柠檬酸盐作为抗凝剂，标本采集后1000×g 离心15 min，立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融
(注意：标本溶血会影响检测结果，因此溶血标本不宜进行检测)。

6.3 尿液：收集尿液后，1000×g离心20 min，取上清，立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融。

6.4 唾液：收集唾液后10000×g 离心5 min，取上清立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融。

6.5 母乳：收集样本后，在2-8℃条件下1000×g离心15 min，取澄清部分，重复此过程2次，立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融。

七：试剂准备

7.1 洗涤液（1×）的配制：

如果洗涤液（20×）有晶体析出，37℃加热至晶体全部溶解。按1:20稀释倍数进行稀释：如取30 mL 浓缩洗涤液（20×），加入570 mL 超纯水或去离子水，得到1×洗涤液。

7.2 抗体混合液（1×）的配制：

开盖前瞬时离心，将捕获抗体和检测抗体稀释分别按1:100比例稀释到同一管稀释液中，配制成检测所需的工作液。例如：将50 uL包被抗体浓缩液（100×）和50 uL检测抗体浓缩液（100×）加入 4900 uL抗体稀释液，混匀配制成1×抗体混合液。

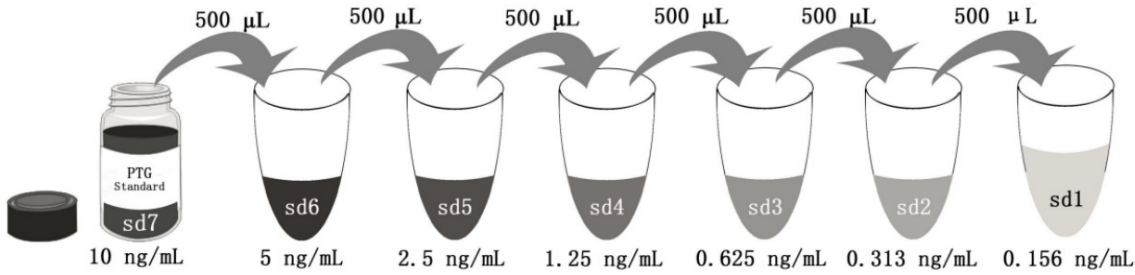
7.3 待检测样本：

不同的样本使用相应的样本稀释液进行稀释，样本最低稀释比为1:2，即每个样本孔中最多加入样本原液25 uL。
如果样本检测值超过标曲最高范围，可将样本进一步稀释后再进行实验，使样本的检测值处于标曲范围内，不同样本的稀释倍数需自行优化。

稀释比推荐如下：人血清和血浆样本1:4000000或1:8000000稀释；食蟹猴血清和血浆样本1:4000000或1:8000000稀释；尿液样本1:800或1:1600稀释；唾液样本1:400或1:800稀释；母乳样本1:4000或1:8000稀释；样品采集、处理和储存的差异可能导致测值的改变。

7.4 梯度稀释的标准品：

使用2 mL PT 4B1 样本稀释液复溶标准品，具体操作如下：



Add # µL of Standard diluted in the previous step	—	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
# µL of Sample Diluent PT 4B1	2000 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
	"sd7"	"sd6"	"sd5"	"sd4"	"sd3"	"sd2"	"sd1"

八：实验步骤

实验前,需要将所需试剂在室温平衡20-30 min (捕获抗体浓缩液和HRP标记检测抗体浓缩液不需要平衡室温,即用即取); 在进行标准品、样本以及不同试剂加样时,更换枪头,避免接触微孔板的内表面,不同的试剂,使用不同的加样槽;

8.1 根据实验用量,取出需要用到的酶标板条,剩余板条加入干燥剂放入铝箔袋密封后存放于4°C,并于一周之内用完;

8.2 加样,分别设零孔、标准孔、待测样本孔。零孔加样本稀释液50 μ L,余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本50 μ L/孔,注意不要产生气泡(建议标准品和样本都做复孔,尽量避免实验误差,确保上样不间断,5-10 min 完成加样);

8.3 每孔加50 μ L 抗体混合液(1 $\times$)(参照试剂准备部分7.2),盖上封板膜,恒温振荡器上37°C 400 rpm 孵育 1 h(若无恒温振荡器,此步骤建议37°C静置孵育2 h);

8.4 洗涤

1) 揭开封板膜(动作轻柔,避免动作过大导致液体溢出串孔),弃液体,拍干;

2) 洗涤液(1 $\times$)洗涤板条,每孔350-400 μ L,洗涤后,甩掉液体拍干板条,重复此步骤4次,避免异物进入板孔;

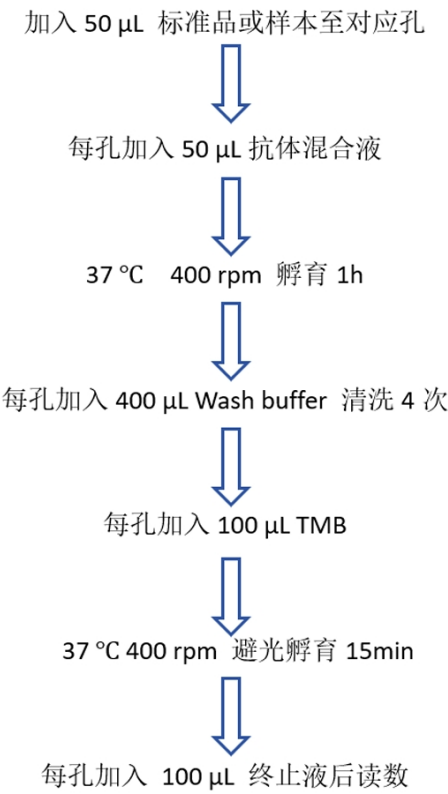
8.5 显色:每孔加TMB显色液100 μ L,恒温振荡器上37°C 400 rpm 孵育15-20 min(如果颜色偏浅,可适当延长显色时间,不超过30 min;保持显色底物始终处于避光状态,显色底物在加样前应是无色透明,如有变色,请勿使用);

8.6 终止:每孔加终止液100 μ L,蓝色变黄色。终止液与TMB显色液的加样顺序一致;(注意:眼睛和皮肤避免接触终止液)

8.7 读数:以630 nm为校正波长,用酶标仪在450 nm波长测量各孔的光密度(OD值)。加入终止液后5 min内进行读数,若无630 nm波长,也可直接使用450 nm波长读数;

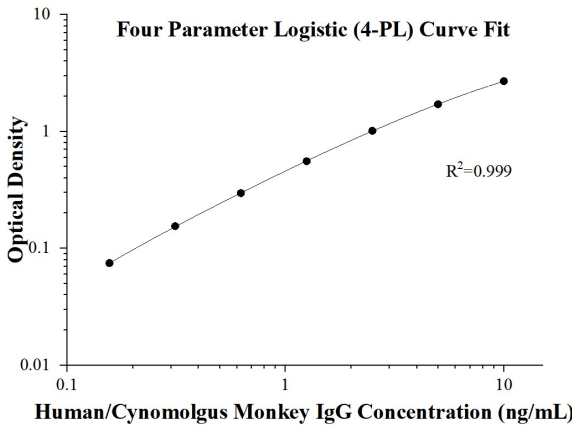
8.8 数据分析:每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值,设置复孔,取其平均值。以标准品的浓度为横坐标,OD值为纵坐标,使用专业软件(如Origin、ELISACalc等)进行四参数拟合(4-PL),根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度,乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

操作流程如下：



九：实验参数

9.1 参考标曲图



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.0536 0.0494	0.0515	-
0.156	0.1267 0.1256	0.1262	0.0747
0.313	0.2108 0.2016	0.2062	0.1547
0.625	0.3503 0.3473	0.3488	0.2973
1.25	0.6195 0.596	0.6078	0.5563
2.5	1.0675 1.0632	1.0654	1.0139
5	1.7608 1.7672	1.7640	1.7125
10	2.7393 2.7523	2.7458	2.6943

9.2 精密度

板内精密度: 3个不同浓度的样本在板内重复测定 8 次；

板间精密度: 3个不同浓度的样本在板间重复测定 16 次。

板内精密度 (CV内)					板间精密度 (CV 间)				
样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%	样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%
1	8	5.43	0.20	3.68	1	16	5.81	0.58	9.98
2	8	1.16	0.04	3.45	2	16	1.21	0.08	6.61
3	8	0.62	0.05	8.06	3	16	0.63	0.05	7.94

9.3 加标回收率

样本稀释后，在标曲范围内选择高、中、低3个浓度，进行人/食蟹猴IgG的加标回收率实验，结果如下：

样本类型	稀释倍数	平均值 (%)	范围 (%)
人血浆	1:16000000	118	114-124
	1:32000000	95	83-103
食蟹猴血清	1:16000000	103	101-104
	1:32000000	103	102-105
人尿液	1:3200	100	96-103
	1:6400	107	102-116
人唾液	1:1600	100	96-105
	1:3200	96	93-100
母乳	1:16000	101	96-109
	1:32000	99	98-100

9.4 样本值

血浆/血清/尿液/唾液/母乳 - 应用本试剂盒，检测血浆、血清、尿液、唾液以及母乳样本中人/食蟹猴IgG的浓度。

样本类型	均值 (mg/mL)	范围 (mg/mL)
人血浆样本 (n=16)	10.32	3.49-31.70
食蟹猴血清 (n=11)	14.06	7.91-20.25

样本类型	均值 (ng/mL)	范围 (ng/mL)
人尿液样本 (n=8)	2002.81	365.91-4860.26
人唾液样本 (n=8)	2236.75	202.17-8851.72

样本类型	均值 (ug/mL)	范围 (ug/mL)
母乳样本 (n=8)	12.82	5.53-23.30

9.5 灵敏度

用20个重复的零孔平均OD值加上两倍标准差得到的OD值带入标准曲线拟合出对应的浓度值，此试剂盒中人/食蟹猴IgG的灵敏度为0.02 ng/mL。

9.6 线性

用对应样本稀释液稀释样本，使稀释后的检测值处于标曲范围内，线性数据如下：

（人血浆样本预先稀释2000000倍，食蟹猴血清样本预先稀释2000000倍，人尿液样本预先稀释400倍，人唾液样本预先稀释200倍，母乳样本预先稀释2000倍。）

		人血浆	食蟹猴血清	人尿液	人唾液	母乳
1:2	均值 (%)	100	100	100	100	100
	范围 (%)	-	-	-	-	-
1:4	均值 (%)	105	105	105	101	89
	范围 (%)	104-107	103-106	98-112	98-104	81-97
1:8	均值 (%)	110	111	110	102	95
	范围 (%)	108-112	110-111	107-112	99-105	83-107
1:16	均值 (%)	112	110	113	104	109
	范围 (%)	112-113	108-112	110-117	97-111	96-122

9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人/食蟹猴IgG。

加入50 ng/mL以下因子，无明显交叉反应：

Human：

IgA2

IgE

IgD

IgM

加入6.25 ng/mL以下因子，有交叉反应：

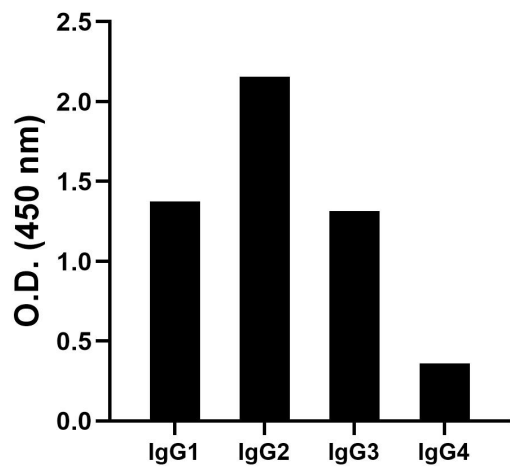
Human：

IgG1

IgG2

IgG3

IgG4



十：参考文献

1. Vidarsson, Gestur et al. Frontiers in immunology vol. 5 (2014): 520.
2. Napodano, Cecilia et al. Immunological investigations vol. 50,4 (2021): 427-444.
3. Palmeira, Patricia et al. Clinical & developmental immunology vol. 2012 (2012): 985646.
4. Krištić, Jasminka, and Gordan Lauc. Immunological reviews vol. 328,1 (2024): 143-170.
5. Radovani, Barbara, and Falk Nimmerjahn. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) vol. 213,11 (2024): 1573-1584.
6. Ma, Hui, and Richard O'Kennedy. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) vol. 1348 (2015): 7-11.