小鼠卵清蛋白特异性IgG1(OVA-sIgG1)

酶联免疫吸附测定试剂盒

本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断

使用说明书

- **货号**：JL20468
- **检测范围**：定性检测
- **规格**：5×96T/96T/48T
- **保存温度**：2-8℃
- **种属**：小鼠
- **有 效 期**：6个月

简介：

卵清蛋白(OVA)是在蛋清中发现的主要蛋白，约占总蛋白的55%。卵清蛋白与丝氨酸超家族的序列和三维有同源性，但与大多数丝氨酸不同，它不是丝氨酸蛋白酶抑制剂。它有385个氨基酸组成，其相对分子质量为42.7 kDa。卵清蛋白从细胞中分泌出来，以内部信号序列（残基21-47）为目标，而不是其他分泌蛋白中常见的N端信号序列。

实验原理：

本试剂盒采用间接法酶联免疫吸附试验（ELISA）。往预先包被有卵清蛋白抗原的微孔中，依次加入样本、阳性对照、阴性对照、HRP标记的二抗，中间经过温育和洗涤，用底物TMB显色，TMB在过氧化物酶(HRP)的催化下转化成蓝色，并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样本中的小鼠卵清蛋白特异性IgG1(OVA-sIgG1)呈正相关。用酶标仪在450nm波长下测定吸光度（OD值），判断样本阴阳性。

特异性：可检测样本中小鼠的OVA-sIgG1，且与其类似物无明显交叉反应。

注意事项:

1. 严格按照规定的时间和温度进行温育以保证准确结果。所有试剂都必须在使用前达到室温 20-25℃。使用后立即冷藏试剂。
2. 洗板不正确可能导致不准确的结果。在加入底物前确保尽量吸干孔内液体。整个过程中不要让微孔干燥时间过长。
3. 清洁板底残留的液体和手指印，否则影响 OD 值。
4. 底物显色液应呈无色的颜色，已经变蓝的底物液不能使用。
5. 避免试剂和样本的交叉污染以免造成错误结果。
6. 在储存和温育时避免强光直接照射。
7. 任何反应试剂不能接触漂白溶剂或漂白溶剂所散发的强烈气体。任何漂白成分都会破坏试剂盒中试剂的生物活性。
8. 不能使用过期产品，不同货号和批号组分不得混用。
9. 试剂盒以外来源的重组蛋白可能会出现与本试剂盒抗体不匹配而不被识别的情况。
10. 如果可能传播疾病，所有的样本都应管理好，按照规定的程序处理样本和检测装置。

试剂盒组成：

名称	5×96孔配置	96孔配置	48孔配置	备注
预包被 96 孔酶标板 Pre-coated Assay Plate	5×8 孔×12 条	8 孔×12 条	8 孔×6 条	无
阳性对照品 Positive control	10 支	2 支	1 支	按说明书进行稀释
阴性对照品 Negative control	10 支	2 支	1 支	按说明书进行稀释
通用稀释液 Universal Diluent	10×20mL	2×20mL	1×20mL	无
浓缩HRP-二抗 HRP-antibody (100×)	5×120μL	120μL	60μL	按说明书进行稀释
20×洗涤液 Wash Buffer (20×)	10×10mL	2×10mL	1×10mL	按说明书进行稀释
底物（TMB） TMB Substrate	5×10mL	10mL	5mL	无
终止液 Stop Solution	5×6mL	6mL	3mL	无
封板膜 Plate Sealer	20 张	4 张	4 张	无
说明书 Instruction Manual	1 份	1 份	1 份	无

样本处理及要求：

1. **试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围**，建议实验前通过相关文献预估样本中待测物的浓度并通过预实验确定样本的实际浓度。如果样本中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
2. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议做预实验验证其检测有效性。
3. **血清**：将收集于血清分离管的全血样本在室温放置2小时或2-8℃过夜，然后1000×g离心20分钟，取上清即可，或将上清置于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。
4. **血浆**：用EDTA或肝素作为抗凝剂采集样本，并将样本在采集后的30分钟内于2-8℃1000×g离心15分钟，取上清即可检测，或将上清置于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。
5. **组织匀浆**：用预冷的PBS (0.01M, pH=7.4)冲洗组织，去除残留血液（匀浆中裂解的红细胞会影响检测结果），称重后将组织剪碎。将剪碎的组织与对应体积的PBS（一般按1:9的重量体积比，比如1g的组织样本对应9mL的PBS，具体体积可根据实验需要适当调整，并做好记录。推荐在PBS中加入蛋白酶抑制剂）加入玻璃匀浆器中，于冰上充分研磨或匀浆机研磨。为了进一步裂解组织细胞，可以对匀浆液进行超声破碎，或反复冻融。最后将匀浆液于5000×g离心5~10分钟，取上清检测。
6. **细胞培养物上清**：请1000×g离心20分钟，取上清即可检测，或将上清

置于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。

7. **细胞裂解液**：贴壁细胞用预冷PBS轻轻清洗，然后用胰蛋白酶消化，1000×g离心5分钟后收集细胞；悬浮细胞可直接离心收集。收集的细胞用预冷PBS清洗3次，每1×10^6个细胞中加入150-200μL PBS重悬（推荐在PBS中加入蛋白酶抑制剂；若含量很低可适当减少PBS体积）并通过反复冻融或超声使细胞破碎。将提取液于2-8℃，1500×g离心10分钟，取上清检测。
8. **其它生物样本**：1000×g离心20分钟，取上清即可检测。
9. **样本外观**：样本应清澈透明，悬浮物应离心去除。
10. **样本保存**：样本收集后若在1周内进行检测的可保存于4℃，若不能及时检测，请按一次使用量分装，冻存于-20℃（1个月内检测），或-80℃（6个月内检测），避免反复冻融，样本溶血会影响最后检测结果，因此溶血样本不宜进行此项检测。

实验所需自备试验器材：

1. 酶标仪（450nm）
2. 高精度移液器及吸头：0.5-10μL、5-50μL、20-200μL、200-1000μL
3. 37℃恒温箱
4. 蒸馏水或去离子水

检测前准备工作：

1. 请提前10分钟从冰箱中取出试剂盒，平衡至室温。
2. **阳性和阴性对照品工作液配制**：分别加入1mL通用稀释液至冻干对照品中，静置15分钟待其完全溶解后轻轻混匀。
3. **HRP-二抗工作液配制**：使用前15分钟将100×浓缩HRP-二抗于1000×g离心1分钟，以通用稀释液将100×浓缩HRP-二抗稀释成1×工作浓度(例：10μL浓缩液+990μL通用稀释液)，现配现用。
4. **1×洗涤液配制**：取10mL 20×洗涤液到190mL蒸馏水中（从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶，属于正常现象，可放置室温，轻摇均匀，待结.晶完全溶解后再配制)。

操作步骤：

1. 从室温平衡10分钟后的铝箔袋中取出所需板条，剩余板条用自封袋密封放回4℃。

2. 加样：分别将样本或阳性阴性对照品按照100μL每孔加入相应孔中，空白孔加入100μL通用稀释液。盖上封板膜后37℃温育60分钟。（**建议：将待测样本用通用稀释液最低稀释1倍后再加入酶标板内测试，**从而减少基质效应对测试结果的影响。所有的待测样本和阳性、阴性对照品在检测中建议设立复孔）。

3. 洗板：弃去液体，每孔加入300μL 1x洗涤液，静置1分钟，甩去洗涤液，吸水纸上拍干，如此重复洗板3次（也可用洗板机洗板）。

4. 加HRP-二抗：每孔加100μL HRP-二抗工作液，盖上封板膜后37℃温育30分钟。

5. 洗板：弃去液体按步骤3洗涤方法，洗板5次

6. 加底物：每孔加入90μL底物(TMB)，盖上封板膜，37℃避光温育15分钟。

7. 加终止液：取出酶标板，每孔直接加入50μL终止液，立即在450nm波长处测定各孔的OD值。

实验结果计算：

计算公式：

$$S/P\ 值= \frac{待检样本\ OD\ 值 - 阴性对照品平均\ OD\ 值}{阳性对照品平均\ OD\ 值 - 阴性对照品平均\ OD\ 值}$$

（注：“P”表示阳性对照品；“N”表示阴性对照品；“S”等表示待检样本）

判定：

1. 试验结果有效的条件是：阳性对照品孔的平均 OD 值 > 0.20，阴性对照品孔的平均 OD 值 < 0.20。
2. 检测样本 S/P 值≥0.2 时，判定为阳性样本；检测样本 S/P 值 < 0.2 时，判定为阴性样本。

试剂盒性能：

重复性：板内变异系数小于 10%，板间变异系数小于 10%。

参考文献：

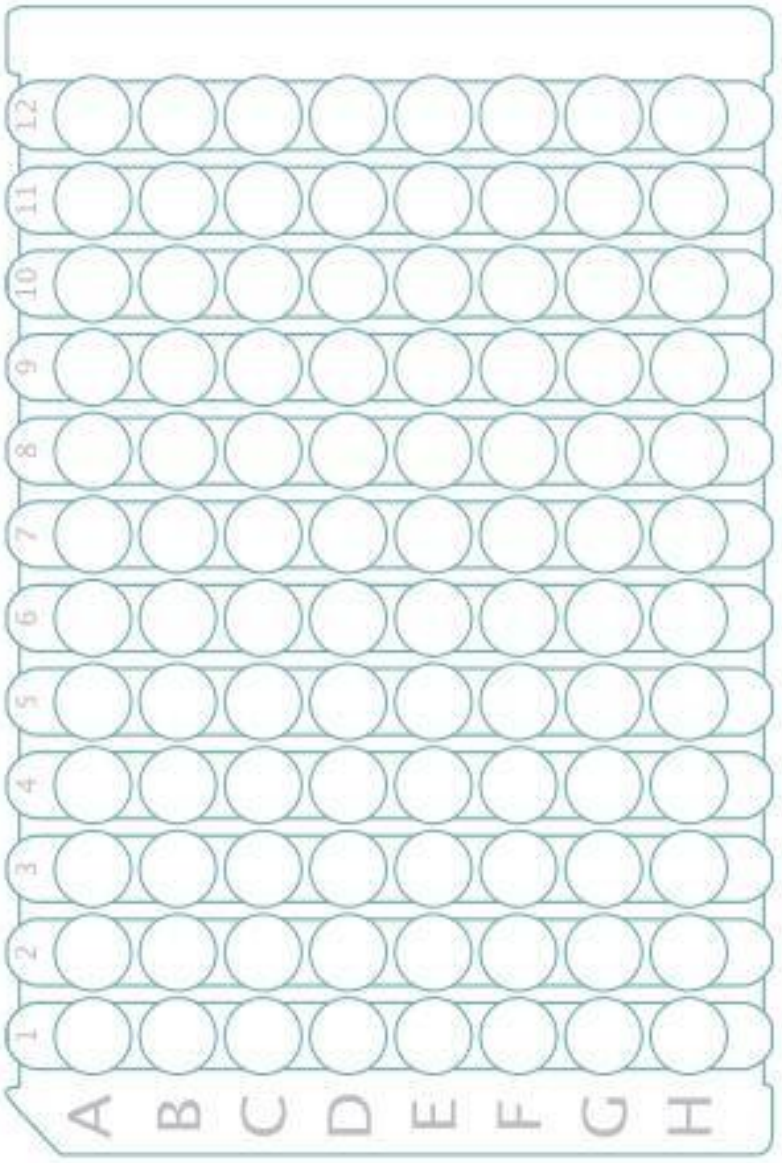
1. Hu HY, Du HN (April 2000).Journal of Protein Chemistry. 19 (3): 177–83.

2. Gettins PG (December 2002).Chemical Reviews. 102 (12): 4751–804.

3. Li, M., Davey, G. M.,Lew, A. M., Hirst, C., ... & Heath, W. R. (2001).The Journal of Immunology, 166(10), 6099-6103.

4. Kumar, R. K., Herbert, C., & Foster, P. S. (2008)Current drug targets, 9(6), 485-494.

5. Croguennec,T.,Nau,F.,Pezennec,S.,& Brule, G. (2000).Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(10), 4883-4889.


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

咨询电话：400-0066-400

传　　真：021-55660885

电子邮箱：shjlsw@163.com

网　　址：www.jonln.com