biosharp®
Life sciences

仅供研究，不用于临床诊断。

ELISA试剂盒使用说明书

Rat IgM ELISA Kit

本试剂盒用于定量检测大鼠血清、血浆或细胞培养上清液等样本中天然和重组IgM浓度。使用前请仔细阅读说明书并检查试剂组分，如有任何疑问请与合肥兰杰柯科技有限公司联系，公司将为您提供强有力的技术支持。

全国统一热线：400-600-4213
www.biosharp.cn

目 录

一、产品简介 2
二、检测原理 2
三、试剂盒组分 3
四、储存条件 3
五、注意事项 3
六、其它实验材料 4
七、使用说明 4
1、样品收集、处理及保存方法 4
2、试剂准备 4
3、操作步骤 5
4、操作流程图 6
5、操作要点提示 6
6、结果判断 6
八、常见问题分析及解决 8

Rat IgM (免疫球蛋白M) ELISA KIT

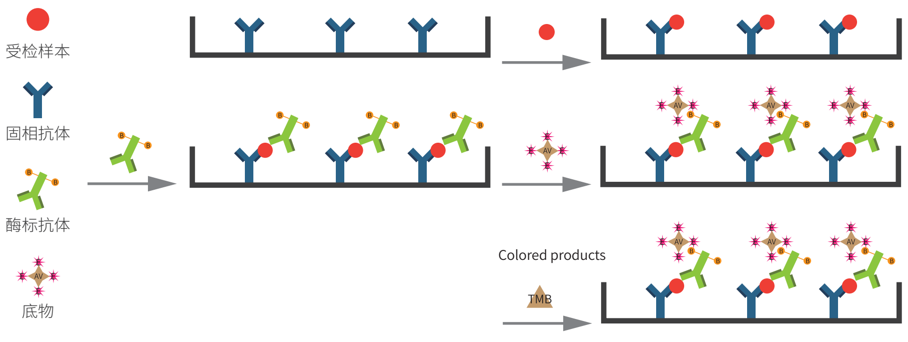
货号	名称	规格
BSER-017-48T	Rat IgM (免疫球蛋白M) ELISA KIT	48T
BSER-017-96T	Rat IgM (免疫球蛋白M) ELISA KIT	96T

一、产品简介

IgM(免疫球蛋白M)占血清免疫球蛋白总量的5%-10%。单体IgM以膜结合型表达于细胞表面，构成B细胞抗原受体(BCR)。分泌型IgM是由多个免疫球蛋白通过共价二硫键连接在一起形成的五聚体，也可形成六聚体，是分子量最大的免疫球蛋白，沉降系数为19S，称为巨球蛋白，一般不能通过血管壁，主要存在于血液中。血清中检出IgM 提示新近发生感染，可用于感染的早期诊断。本试剂主要用于大鼠中免疫球蛋白盒M的检测。

二、检测原理

本实验采用双抗体夹心ELISA。用抗大鼠IgM单克隆抗体预包被酶标板，加入适度稀释的样本和标准品，其中的IgM会与其单抗结合，洗去游离成分；加入酶标抗体，酶标抗体与结合在单抗上的大鼠IgM结合而形成免疫复合物，洗去未结合的酶标抗体；加入显色剂，若反应孔中有IgM，辣根过氧化物酶会使无色的显色剂现蓝色；加终止液变黄。在450nm下测OD值，IgM浓度与OD_{450}值之间呈正比，可通过绘制标准曲线计算出标本中IgM浓度。



三、试剂盒组成

组分编号	组分	96t	48t	储存条件
BSER-017-1	标准品	2支	1支	-20℃
BSER-017-2	标准品和标本稀释液	4瓶	2瓶	2-8℃
BSER-017-3	浓缩酶标抗体(避光)	2支	1支	2-8℃
BSER-017-4	酶标抗体稀释液	1瓶	1瓶	2-8℃
BSER-017-5	浓缩洗涤液 20×	1瓶	1瓶	2-8℃
BSER-017-6	显色剂(避光)	1瓶	1瓶	2-8℃
BSER-017-7	终止液	1瓶	1瓶	2-8℃
BSER-017-8	抗体包被板条	8×12	8×6	2-8℃
BSER-017-9	封板胶纸	4张	2张	2-8℃
	说明书	1份	1份	

四、储存条件

未启封试剂盒2-8℃保存有效期6个月，启封后建议一个月内使用完毕。产品收到后标准品-20℃保存，其它组分2-8℃保存。

五、注意事项

1、试剂盒保存在2-8℃，除复溶后的标准品，其它成分不可冷冻。

2、浓缩酶标抗体装量极少，运输中颠簸和可能的倒置会使液体沾到管壁或瓶盖。使用前请离心处理以使附着于管壁或瓶盖的液体沉积到管底。

3、不同批号试剂不可混用。

4、为避免交叉污染请使用一次性吸头。

5、终止液和显色剂具腐蚀性，避免皮肤及粘膜直接接触，一旦接触到这些液体，请尽快用大量水冲洗。

6、使用干净的塑料容器配制洗涤液，使用前充分混匀试剂盒里的各种成份及样品。

7、洗涤酶标板时应充分拍干，不要将吸水纸直接放入酶标反应孔中吸水。

8、不要用其它来源的试剂混合或替代该产品的组分，不同批号的试剂盒组份不能混用，请在有效日期内使用本产品。

9、在试验中标准品和样本检测时建议作双复孔或三复孔，加入试剂的顺序应一致，以保证所有反应孔孵育的时间一样。

10、充分混匀对反应结果尤为重要，最好使用微量振荡器(使用最低频率进行振荡)。

11、避免操作过程中酶标板干燥，干燥会使酶标板上生物成分迅速失活，影响实验结果。

12、适当的稀释样品，使样品值落在标准曲线范围内，根据待测因子含量高、中、低的不同，建议采用1:100、1:10、1:2稀释样品。如果样品OD值高于最高标准，适当增加稀释度并重复检测。

13、标准品稀释液，操作人，移液方式，洗涤方法，孵育时间及温度，试剂盒批次的不同均可能会导致结果的差异。

14、此法可有效的消除可溶性受体、结合蛋白以及生物样品中的其他因素的干扰。

六、其它实验材料

1、酶标仪(450 nm)

2、高精度可调移液器及吸头：0.5-10，2-20，20-200，200-1000 μL;一次检测样品较多时，最好用多通道移液器

3、自动洗板机或洗瓶

4、37°C温箱

5、双蒸水或去离子水

6、坐标纸

7、量筒

七、使用说明

7.1 样品收集、处理及保存方法

1.血清：使用不含热原和内毒素的试管，收集血液后，室温凝血30min，1000×g离心10min，小心分离血清。

2.血浆：用EDTA、柠檬酸盐、肝素作为抗凝剂收集血浆，收集后30min内以1000×g离心15min去除颗粒。

3.细胞上清液：1000×g离心10min去除颗粒和聚合物。

4.保存：若样品不立即检测，请将其按一次用量分装，-20°C—-70°C保存，避免反复冻融。尽量避免使用溶血或高血脂样本。如果血清中含有大量颗粒，检测前先离心或过滤去除；室温下解冻，请勿于37°C或更高的温度加热解冻。

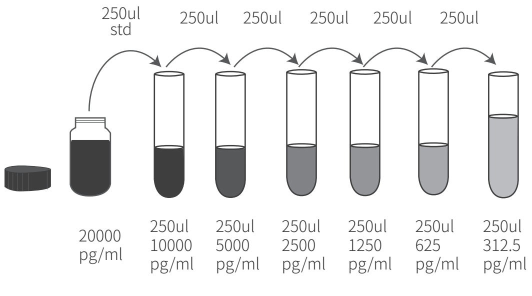
5.稀释：可根据实际情况，将标本做适当倍数稀释(建议做预实验，以确定稀释倍数) 。

7.2 试剂准备

1、提前30 min从冰箱中取出试剂盒，平衡至室温。

2、洗涤缓冲液：从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶，这属于正常现象，加热并轻轻摇晃使结晶完全溶解后再配制。将浓缩洗涤液用双蒸水稀释(1:20)。未用完的放回4°C。

3、标准品：加入标准品/标本稀释液0.5mL至冻干标准品中，待彻底溶解后，静置15分钟混匀(浓度为20000pg/mL)，然后根据需要进行稀释，见下图(建议标准曲线使用以下浓度：20000、10000、5000、2500、1250、625、312.5、0pg/mL)。稀释的标准品不得重复使用，未用完的标准品应按照一次用量分装后，将其放在-20～-70°C贮存，一次性使用，避免反复冻融。



标准品稀释方法

4、酶标抗体工作液：以酶标抗体稀释液稀释浓缩酶标抗体(1:100)。最好现用现配。

浓缩酶标抗体稀释方法

所用板条数	浓缩酶标抗体	+	酶标抗体稀释液
12	110μL	+	10890μL
10	90μL	+	8910μL
8	70μL	+	6930μL
6	50μL	+	4950μL
4	33μL	+	3267μL
2	17μL	+	1683μL
1	9μL	+	891μL

7.3 操作步骤

1.按照上述准备工作配制好各种溶液。

2.根据待测样品数量和标准品的数量决定所需的板条数，并增加1孔作为空白对照孔。分别将标本和不同浓度标准品(100μL/孔)加入相应孔中，用封板胶纸封住反应孔（零孔只加标准品/样本稀释液），室温孵育120分钟（空白对照孔除外）。充分混匀对反应结果尤为重要，要使用微量振荡器(最低频率700rpm)。

3.洗板4次：(1)自动洗板机：要求注入的洗涤液为350μL，注入与吸出间隔15-30秒。(2)手工洗板：甩尽孔内液体，每孔加洗涤液350μL，静置30秒后甩尽液体，在厚迭吸水纸上拍干。

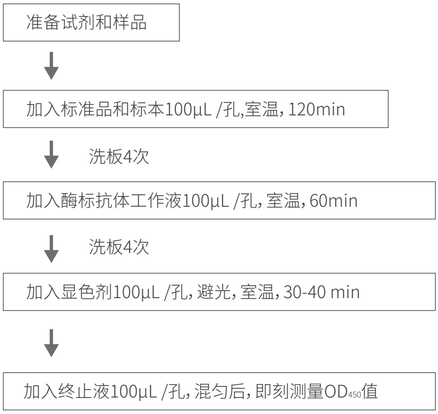
4.加入酶结合物工作液(100μL/孔)。用封板胶纸封住反应孔，室温孵育60分钟（空白对照孔除外）。使用微量振荡器(使用最低频率700rpm)。

5.洗板4次。

6.加入显色剂100 μL/孔，避光，室温孵箱孵育30-40分钟。

7.加入终止液100 μL/孔，混匀后即刻测量OD_{450}值(5分钟内)。

7.4 操作流程图



7.5 操作要点提示

1、配制各种试剂时要充分混匀，但要避免产生大量泡沫，以免加样时加入大量的气泡，产生加样误差。

2、为避免交叉污染，在加入不同浓度的标准品、不同样品、不同试剂时谨记及时更换吸头。

3、为了确保准确的结果，在每次孵育前均需使用新封板胶纸封住反应孔。

4、显色剂在添加之前，应保持无色，请勿使用已变为蓝色的显色溶液。最佳显色时间对标准曲线很重要，肉眼可见前3-4孔有梯度蓝色，后3-4孔差别不明显，零孔无蓝色出现即可终止。

5、每次检测均要做标准曲线，根据样品待测因子的含量，适当稀释或浓缩样本，最好做预实验。

7.6 结果判断

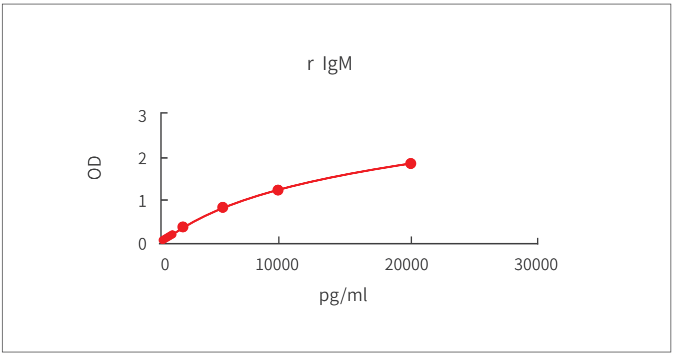
1、每个标准品和标本的OD值应减去空白孔的OD值，如果做复孔，求其平均值。

2、使用计算机软件以吸光度OD值为纵坐标(Y)，相应的IgM标准品浓度为横坐标(X)，生成相应的标准曲线，样品的IgM含量可根据其OD值由标准曲线换算出相应的浓度。

3、若标本OD值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测，计算浓度时应乘以稀释倍数算标本含量。

参考数据：

标准品浓度(pg/mL)	OD值1	OD值2	平均值	矫正值
0	0.066	0.068	0.067	——
312.5	0.083	0.089	0.086	0.019
625	0.129	0.133	0.131	0.064
1250	0.215	0.223	0.219	0.152
2500	0.368	0.372	0.370	0.303
5000	0.663	0.671	0.667	0.600
10000	1.206	1.212	1.209	1.142
20000	1.917	1.923	1.920	1.853



注：本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线为准

结果重复性：

板间，板内变异系数均<10%。

灵敏度：

最低检测大鼠IgM剂量小于156pg/mL。最低检出量测定方法：20个零标准的平均OD值增加两个标准差，再计算相应的浓度。

特异性：

此试剂盒可检测天然和重组的大鼠IgM。

八、常见问题分析及解决

问题	可能原因	解决办法
无颜色	不同试剂盒或不同批号的试剂混合	重新检查试剂的标签，确准所有组分都属于正使用的试剂盒中的。不能混用不同试剂盒或不同批号的试剂。
	漏加酶	检查操作流程，注意不要漏加
	HRP酶污染了叠氮钠	使用新配制的试剂，禁含叠氮钠
	试剂配制/使用有误	重做试验，严格按说明书操作，每次配制和使用前看清标签
显色弱	超过有效期的产品可能会产生很弱的信号	检查产品有效期
	缩短孵育时间能使实验信号变弱	检查孵育时间
	使用了被污染的试剂	检查试剂是否被污染
	仪器设定不正确，滤光片不匹配	仪器是否设定正确，滤光片的使用等
	洗涤操作不规范	洗涤不充分，使用手工洗板常出现
		洗瓶洗涤，每孔应完全充满洗涤缓冲液，倾出时应迅速
		若用洗板机，应校准并设定足够充满每孔的体积量
		检查每孔是否有残留的洗液或每孔加样量的体积是否准确
		可在两次洗板之间加30秒的浸泡
高背景	实验中孵育温度和时间不适当	确定每一试验步骤的孵育温度和时间是否适当
	酶加量过多	加酶前验看移液器调节量是否准确
		检查稀释度，若必要进行效价测定
全部板子变成规则的蓝色	不充分的洗涤/洗涤步骤被遗漏使没结合的HRP仍有残留	最好使用洗板机充分洗涤
		检查每孔是否有残留的洗液或加样量是否准确
	太多的酶结合物	检查稀释度，必要时进行效价测定
	封板膜或试剂容器被重复使用，导致HRP残留，使TMB底物产生非特异蓝色	使用新封板膜，每步使用不同的试剂容器
高CV值花板	操作不慎或洗涤不充分	按说明书洗板、加样和显色，洗板尤为重要
	出现干板，没有使用封板膜、封板膜重复使用	确定每两步骤间酶标板应保持湿润
		使用封板膜封口，注意每步使用新鲜的封板膜
	移液器不准确，吸头重复使用	检查并校准移液器，每次取样必须更换吸头
标准曲线可得到，但两点之间区别很差（低或平的曲线）	酶结合物不足	检查稀释度，必要时进行效价测定
	检测抗体不足	检查稀释度，必要进行效价测定
	板子显色不足	延长底物孵育时间
		使用推荐品牌的底物溶液
标准曲线很好，但没有任何期望的阳性信号	标本中无相应的待检测物质	使用内参对照
		重复实验，重新考虑实验的相应参数
	标本基质遮盖检测	将标本至少做1:2相应的稀释，或进行系列稀释
标准曲线很好，但标本的判读值很高	标本中含的待检物质水平超过实验范围	稀释标本
边缘效应	工作环境温度不均衡	避免将板子在变化温度环境中孵育
漂移	实验过程中出现间断	整个实验应连续操作，在实验开始前将所有的标准品和标本做适当的准备。
	试剂没有按说明书平衡至室温	在所有试剂加入孔前，确保它们已平衡至室温，除非说明书中有另外的要求。
	是否可更改试剂盒所提供的操作步骤？	一般厂商为确保最高的灵敏度，对试剂盒都进行了优化，为确保每一试剂盒实验的规范性应按说明书操作。
	是否可混用不同批次试剂盒中的试剂？	不可以，绝大多数试剂在每批试剂盒中是特异的，若有问题可与厂家或代理商联系。
	是否可增加或减少标本的体积？	商品化的试剂盒所需加入的标本体积是优化的，应按说明书操作，不建议更改所加标本体积。
	是否可重新确定自己的标准曲线的点？	可以。说明书上有建议制备标准曲线时标准品的稀释度，可改变稀释倍数和增加曲线的点，但是必须在实验范围内，高于试剂盒中最高标准品的点和低于灵敏度以下的点是无效的。

实际加样情况表

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12