

小鼠 H1N1 抗体 (IgM) 酶联免疫分析

试剂盒使用说明书

本试剂盒仅供研究使用

产品编号: CSB-E12868m

特异性: 本试剂盒可检测小鼠 H1N1 特异性 IgM, 与其他相关抗体无交叉反应。

有效期: 6 个月

预期应用: ELISA 法半定量测定小鼠血清、血浆或其它相关生物液体中 H1N1 IgM 含量。

说明

1. 试剂盒保存: -20°C (较长时间不用时); $2-8^{\circ}\text{C}$ (频繁使用时)。
2. 浓洗涤液低温保存会有盐析出, 稀释时可在水浴中加温助溶。
3. 中、英文说明书可能会有不一致之处, 请以英文说明书为准。
4. 刚开启的酶联板孔中可能会含有少许水样物质, 此为正常现象, 不会对实验结果造成任何影响。

实验原理

用甲型 H1N1 流感病毒 (H1N1) 的 HA 蛋白包被酶标板, 制成固相载体。向微孔中先加入待测样品进行反应, 然后再加入辣根过氧化物酶标记抗小鼠 IgM 进行反应, 经过彻底洗涤后用底物 TMB 显色。TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色, 并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的 H1N1 IgM 抗体呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度 (OD 值), 计算样品中抗体的效价 (抗血清最终能显色的最高稀释倍数记为效价)。

试剂盒组成及试剂配制

1. 酶联板 (Assay plate): 一块 (96 孔)。
2. 样品稀释液 (Sample Diluent): $1 \times 20\text{ml}$ /瓶。
3. 辣根过氧化物酶标记抗小鼠 IgM 稀释液 (HRP-anti-mouse IgM Diluent): $1 \times 10\text{ml}$ /瓶。
4. 辣根过氧化物酶标记抗小鼠 IgM (HRP-anti-mouse IgM): $1 \times 120\mu\text{l}$ /瓶 (1: 100)。
5. 底物溶液 (TMB Substrate): $1 \times 10\text{ml}$ /瓶。
6. 浓洗涤液 (Wash Buffer): $1 \times 20\text{ml}$ /瓶, 使用时每瓶用蒸馏水稀释 25 倍。
7. 终止液 (Stop Solution): $1 \times 10\text{ml}$ /瓶 ($2\text{N H}_2\text{SO}_4$)。

需要而未提供的试剂和器材

1. 标准规格酶标仪
2. 高速离心机
3. 电热恒温培养箱
4. 干净的试管和 Eppendorf 管
5. 系列可调节移液器及吸头, 一次检测样品较多时, 最好用多通道移液器
6. 蒸馏水, 容量瓶等

标本的采集及保存

1. 血清: 全血标本请于室温放置 2 小时或室温过夜后于 $1000 \times g$ 离心 20 分钟, 取上清即可检测, 或将标本放于 -20°C 或 -80°C 保存, 但应避免反复冻融。
2. 血浆: 可用 EDTA 或肝素作为抗凝剂, 标本采集后 30 分钟内于 $2-8^{\circ}\text{C}$ $1000 \times g$ 离心 15 分钟, 或将标本放于 -20°C 或 -80°C 保存, 但应避免反复冻融。
3. 细胞培养物上清或其它生物标本: $1000 \times g$ 离心 20 分钟, 取上清即可检测, 或将标本放于 -20°C 或 -80°C 保存, 但应避免反复冻融。

注：标本溶血会影响最后检测结果，因此溶血标本不宜进行此项检测。

标本的稀释原则：

首先通过文献检索的方式了解待测样本的大致含量，确定适当的稀释倍数。稀释的过程中，应做好详细的记录。最后计算抗体效价时，稀释了“N”倍，标本中抗体的效价为“N”。

辣根过氧化物酶标记抗小鼠 IgM 的稀释原则：

临用前以辣根过氧化物酶标记抗小鼠 IgM 稀释液稀释，稀释前根据预先计算好的每次实验所需的总量配制（每孔 100 μ l），实际配制时应多配制 0.1-0.2ml。如 10 μ l 辣根过氧化物酶标记抗小鼠 IgM 加 990 μ l 辣根过氧化物酶标记抗小鼠 IgM 稀释液的比例配制，轻轻混匀，在使用前一小时内配制。

操作步骤

实验开始前，请提前配置好所有试剂，试剂或样品稀释时，均需混匀，混匀时尽量避免起泡。如样品浓度过高时，用样品稀释液进行稀释，以使样品符合试剂盒的检测范围。

1. 加样：分别设空白孔、待测样品孔。空白孔加样品稀释液 100 μ l，余孔加待测样品 100 μ l，注意不要有气泡，加样将样品加于酶标板孔底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀，酶标板加上盖或覆膜，37 $^{\circ}$ C 反应 120 分钟。
2. 弃去液体，甩干，不用洗涤。每孔加辣根过氧化物酶标记抗小鼠 IgM 工作液 100 μ l（取 1 μ l 生物素标记抗体加 99 μ l 生物素标记抗体稀释液的比例配制，轻轻混匀，在使用前一小时内配制），37 $^{\circ}$ C，60 分钟。
3. 温育 60 分钟后，弃去孔内液体，甩干，洗板 5 次，每次浸泡 1-2 分钟，350 μ l/每孔，甩干。
4. 依序每孔加底物溶液 90 μ l，37 $^{\circ}$ C 避光显色（30 分钟内，此时肉眼可见孔内有明显蓝色，即可终止）。
5. 依序每孔加终止溶液 50 μ l，终止反应（此时蓝色立转黄色）。终止液的加入顺序应尽量与底物液的加入顺序相同。为了保证实验结果的准确性，底物反应时间到后应尽快加入终止液。
6. 用酶联仪在 450nm 波长依序测量各孔的光密度（OD 值）。在加终止液后 15 分钟以内进行检测。

注：

1. 用户在初次使用试剂盒时，应将各种试剂管离心数分钟，以便试剂集中到管底。
2. 每次实验留一孔作为空白调零孔，该孔不加任何试剂，只是最后加底物溶液及 2N H₂SO₄。测量时先用此孔调 OD 值至零。
3. 为防止样品蒸发，试验时将反应板放于铺有湿布的密闭盒内，酶标板加上盖或覆膜。
4. 未使用完的酶标板或者试剂，请于 2-8 $^{\circ}$ C 保存。辣根过氧化物酶标记抗小鼠 IgM 工作液请依据所需的量配置使用。请勿重复使用已稀释过的辣根过氧化物酶标记抗小鼠 IgM 工作液。
5. 建议检测样品时均设双孔测定，以保证检测结果的准确性。

洗板方法

手工洗板方法：吸去（不可触及板壁）或甩掉酶标板内的液体；在实验台上铺垫几层吸水纸，酶标板朝下用力拍几次；将推荐的洗涤缓冲液至少 0.3ml 注入孔内，浸泡 1-2 分钟。根据需要，重复此过程数次。

自动洗板：如果有自动洗板机，应在熟练使用后再用到正式实验过程中。

计算

为检测样品中 H1N1 IgM 抗体效价，客户可以采取样品 2 倍倍比稀释样品计算抗体效价，一般采取以 1:40 为起始稀释倍数（使用样品稀释液进行稀释）。最大稀释倍数根据客户自身试

验要求而定，最终显色与阴性对照孔进行比较，有明显差异的最大稀释度定为抗体的最终效价。

注意事项

1. 当混合蛋白溶液时应尽量轻缓，避免起泡。
2. 洗涤过程非常重要，不充分的洗涤易造成假阳性。
3. 一次加样时间最好控制在 5 分钟内，如标本数量多，推荐使用排枪加样。
4. 如标本中待测物质含量过高，请先稀释后再测定，计算时请最后乘以稀释倍数。
5. 在配制检测溶液工作液时，请以相应的稀释液配制，不能混淆。
6. 底物请避光保存。
7. 不要用其它生产厂家的试剂替换试剂盒中的试剂。