

Speedy™ 小鼠IgE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: SE60120
规格: 96T
灵敏度: 0.03 ng/mL
检测范围: 0.313-20 ng/mL
用途: 此试剂盒用于定量检测血清、血浆以及组织裂解液中的小鼠IgE浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

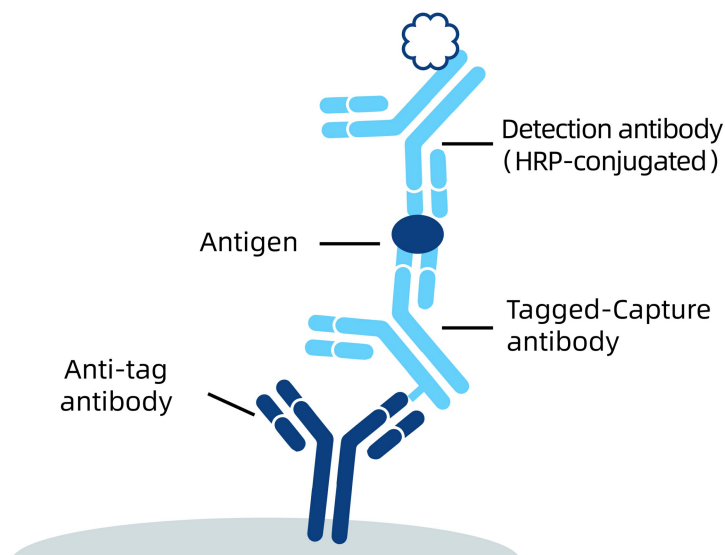
目录

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	5
七：试剂准备	5
八：实验步骤	6
九：实验参数	8
9.1 参考标曲图	8
9.2 精密度	8
9.3 加标回收率	9
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E (IgE) 是由免疫系统产生的一种特殊类型的抗体，在防御寄生虫感染（如线虫）以及介导过敏反应方面起着关键作用。尽管它是人血清中含量最少的抗体亚型，但IgE通过与肥大细胞和嗜碱性粒细胞上的高亲和力受体结合，可引发强烈的免疫反应。当再次接触特定过敏原时，这种结合会迅速释放组胺等炎症化学介质，从而导致典型过敏性哮喘、花粉症和过敏性休克的症状。

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 *	40 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 5-ef	样本稀释液 PT 5-ef (用于小鼠血清和血浆样本)	30 mL/瓶	1 瓶
Sample Diluent PT 5-eg	样本稀释液 PT 5-eg (用于组织裂解液样本)	30 mL/瓶	1 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
Extraction Reagent	裂解液	15 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 组织裂解液：

- 1) 使用预冷的1×PBS清洗组织，吸干水分后，用剪刀剪碎，加入适量的裂解液(加PMSF至裂解液中，终浓度为1 mM，每100 mg组织加入1 mL裂解液，不同样本需自行优化)；
- 2) 转移到预冷玻璃匀浆器中，匀浆约20-30下。匀浆效果与细胞类型和组织类型相关，不同细胞或组织所需的匀浆次数有所不同，需自行优化；
- 3) 匀浆20-30次后取约2-3 μ L细胞或组织匀浆液滴在盖玻片上并在显微镜下观察，如见细胞核周晕环或完整的细胞形态，说明细胞仍完整。如果有70-80%的细胞均无核周晕环和完整细胞形态，说明细胞已经充分破碎，则进行下一步实验。否则，重新匀浆10-30次直到细胞至少90%已经破碎；
- 4) 细胞破碎后8000×g-10000×g离心5 min，分离上清，分装后-80℃存放，并用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定总蛋白浓度，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 μ L包被抗体浓缩液 (100×) 和50 μ L检测抗体浓缩液 (100×) 加入 4900 μ L抗体稀释液，混匀配制成1×抗体混合液。

7.3 待检测样本：

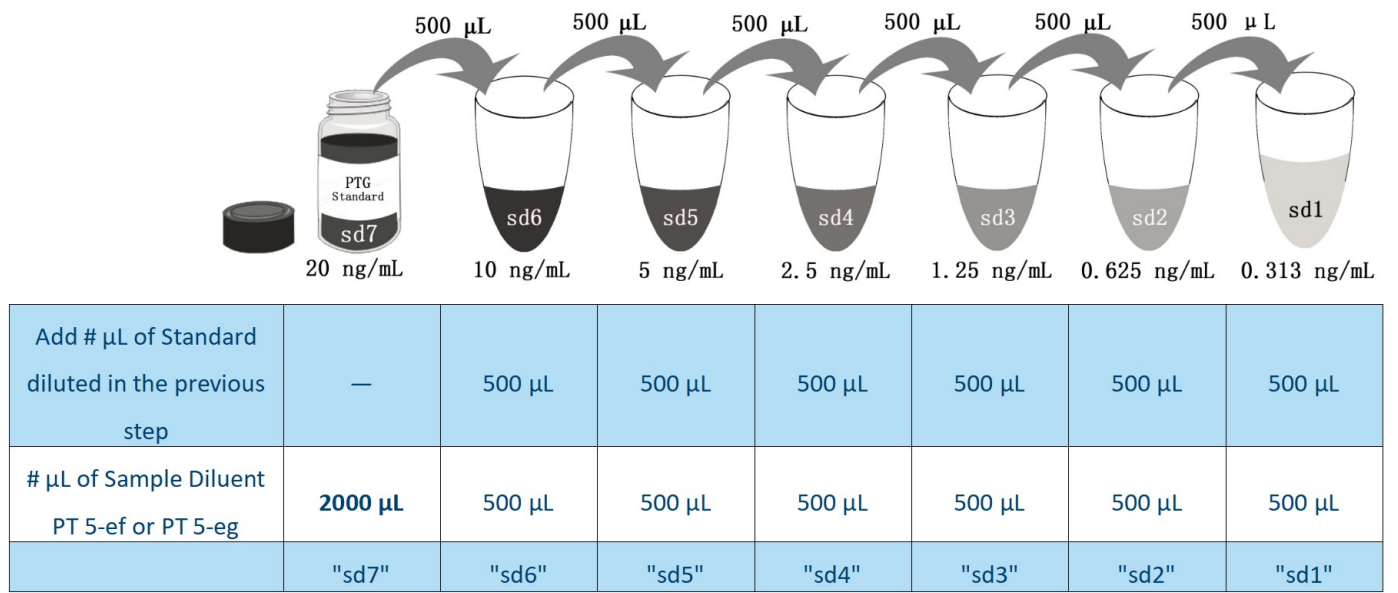
不同的样本使用相应的样本稀释液进行稀释，样本最低稀释比为1:2，即每个样本孔中最多加入样本原液25 μ L。

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：小鼠血清和血浆样本1:8或1:16稀释；组织裂解液样本1:2或1:4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：

检测小鼠血清和血浆样本，用2 mL PT 5-ef 样本稀释液复溶标准品；检测组织裂解液样本，用2 mL PT 5-eg 样本稀释液复溶标准品。具体操作如下：

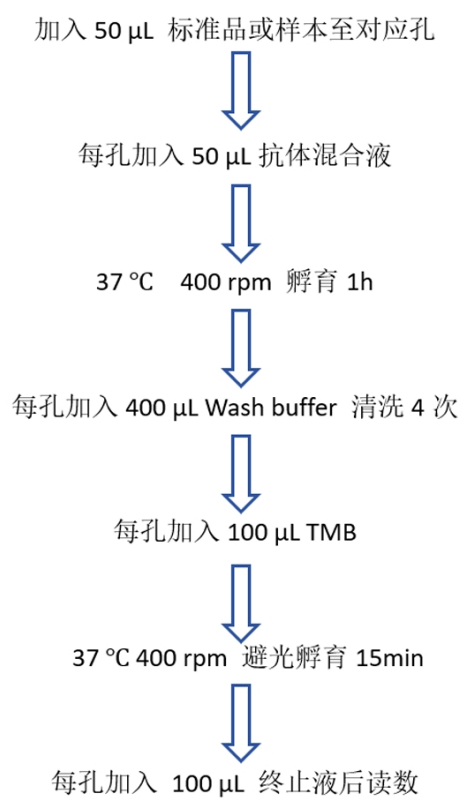


八：实验步骤

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；

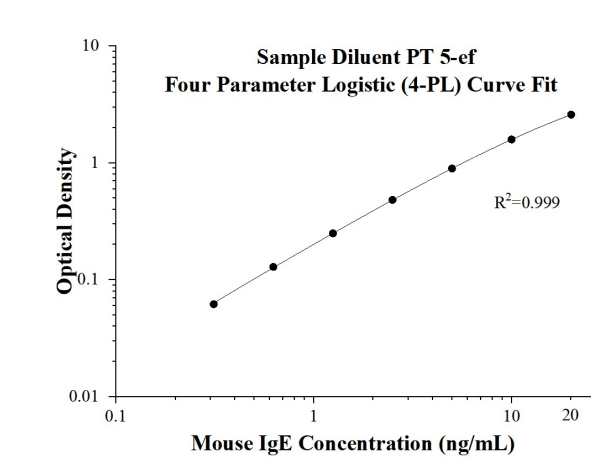
- 8.1 根据实验用量，取出需要用到的酶标板条，剩余板条加入干燥剂放入铝箔袋密封后存放于4℃，并于一周之内用完；
- 8.2 加样，分别设零孔、标准孔、待测样本孔。零孔加样本稀释液50 µL，余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本50 µL/孔，注意不要产生气泡（建议标准品和样本都做复孔，尽量避免实验误差，确保上样不间断，5-10 min 完成加样）；
- 8.3 每孔加50 µL 抗体混合液 (1×)(参照试剂准备部分7.2), 盖上封板膜，恒温振荡器上37℃ 400 rpm 孵育 1 h (若无恒温振荡器，此步骤建议37℃静置孵育2 h) ；
- 8.4 洗涤
 - 1) 揭开封板膜（动作轻柔，避免动作过大导致液体溢出串孔），弃液体，拍干；
 - 2) 洗涤液（1×）洗涤板条，每孔350-400 µL，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 µL，恒温振荡器上37℃ 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 µL，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：

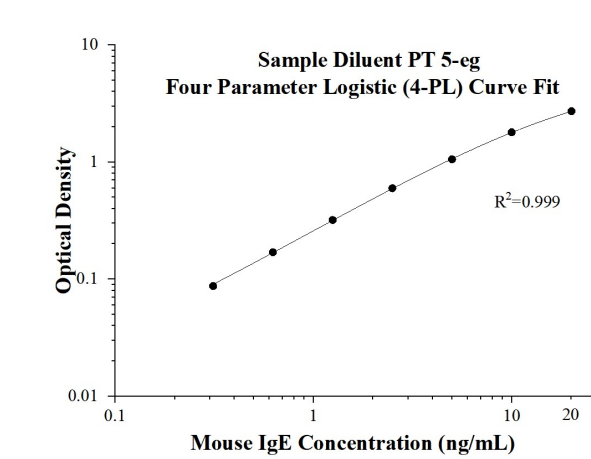


九：实验参数

9.1 参考标曲图



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.0108 0.0099	0.0104	-
0.313	0.0728 0.0714	0.0721	0.0618
0.625	0.1403 0.1379	0.1391	0.1288
1.25	0.2668 0.2534	0.2601	0.2498
2.5	0.5006 0.4846	0.4926	0.4823
5	0.9158 0.8944	0.9051	0.8948
10	1.6111 1.5843	1.5977	1.5874
20	2.5962 2.602	2.5991	2.5888



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.0788 0.0794	0.0791	-
0.313	0.1669 0.1655	0.1662	0.0871
0.625	0.2518 0.2457	0.2488	0.1697
1.25	0.4033 0.3951	0.3992	0.3201
2.5	0.6801 0.6729	0.6765	0.5974
5	1.1322 1.1378	1.1350	1.0559
10	1.8925 1.8551	1.8738	1.7947
20	2.8086 2.7798	2.7942	2.7151

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)				
样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%
1	8	8.73	0.14	1.60
2	8	2.51	0.04	1.59
3	8	1.37	0.04	2.92

板间精密度 (CV 间)				
样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%
1	16	8.63	0.17	1.97
2	16	2.53	0.05	1.98
3	16	1.36	0.04	2.94

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，进行小鼠IgE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 (%)
小鼠血清	1:32	101	98-102
	1:64	102	101-103
组织裂解液	1:8	95	92-96
	1:16	96	95-98

9.4 样本值

小鼠血清 - 应用本试剂盒，检测小鼠血清样本中小鼠IgE的浓度。

样本类型	均值 (ng/mL)	范围 (ng/mL)
小鼠血清样本 (n=16)	31.07	0.97-111.96

组织裂解液

	小鼠IgE (ng/mL)	总蛋白量 (mg/mL)
小鼠脾脏组织裂解液	10.87	7.60

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，此试剂盒中小鼠IgE的灵敏度为0.03 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：

(小鼠血清样本预先稀释4倍。)

		小鼠血清 (样本稀释液 PT 5-ef)	组织裂解液 (样本稀释液 PT 5-eg)
1:2	均值 (%)	100	100
	范围 (%)	-	-
1:4	均值 (%)	97	110
	范围 (%)	91-102	109-111
1:8	均值 (%)	109	116
	范围 (%)	104-115	114-119
1:16	均值 (%)	117	116
	范围 (%)	114-120	114-118

9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组小鼠IgE。

加入50 ng/mL以下细胞因子，无明显交叉反应：

Human：

IgE

十：参考文献

1. McDonnell, J M et al. Annual review of immunology vol. 41 (2023): 255-275.
2. Eckl-Dorna, Julia et al. Cells vol. 8,9 (2019): 994.
3. Luker, Andrea J et al. F1000Research vol. 8 (2019): F1000 Faculty Rev-736.