

## Speedy™ 小鼠IgM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: SE60117  
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和血浆中小鼠IgM浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

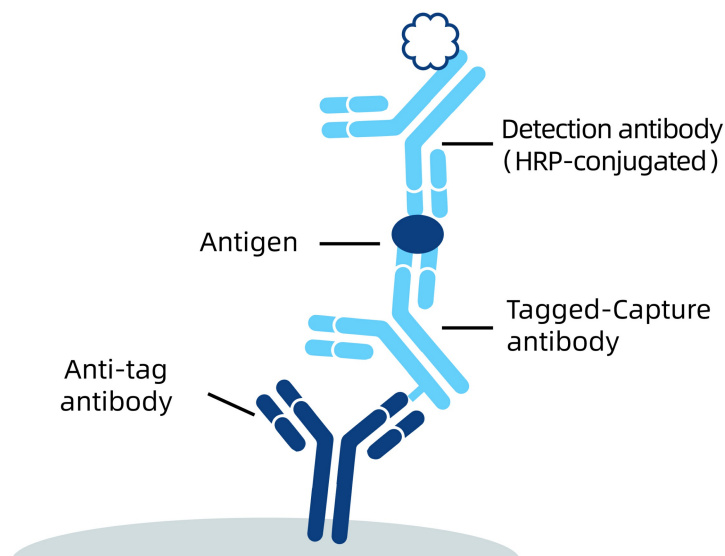
## 目录

|            |   |
|------------|---|
| 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    | 8 |
| 9.5 灵敏度    | 8 |
| 9.6 线性     | 9 |
| 9.7 特异性    | 9 |
| 十：参考文献     | 9 |

## 一：背景信息

IgM 是免疫系统产生的几种抗体（免疫球蛋白）异构体之一，也是机体在接触抗原后产生的第一种抗体。在临床医学中，检测到针对特定病原体（如病毒或细菌）的 IgM 抗体，通常预示着近期感染或急性期发作。随着病程的发展，IgM 水平通常会下降，并被更持久的 IgG 抗体所取代。

## 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 1                                                                                | 样本稀释液 PT 1             | 30 mL/瓶  | 2 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  |
| <b>储存条件：</b><br>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<br>2：已开启试剂盒可在2-8℃存放7天<br>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)。

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：

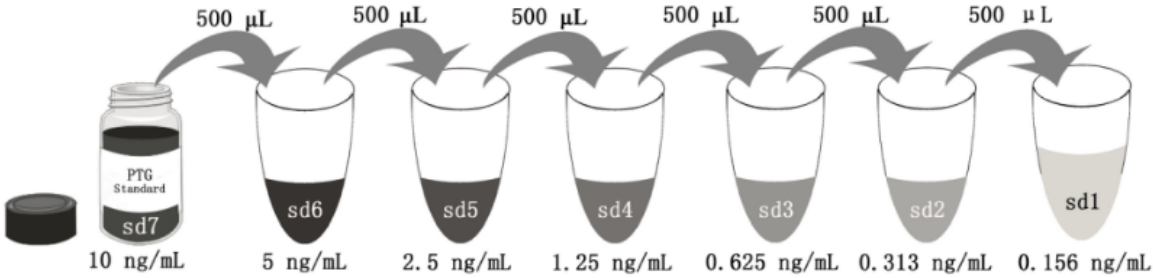
开盖前瞬时离心，将捕获抗体和检测抗体稀释分别按1:100比例稀释到同一管稀释液中，配制成检测所需的工作液。例如：将50 μL包被抗体浓缩液（100×）和50 μL检测抗体浓缩液（100×）加入 4900 μL抗体稀释液，混匀配制成1×抗体混合液。

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 μL。  
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1:40000或1:80000稀释。

7.4 梯度稀释的标准品：

使用2mL PT 1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 1                       | 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  $\mu$ L,余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本50  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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;

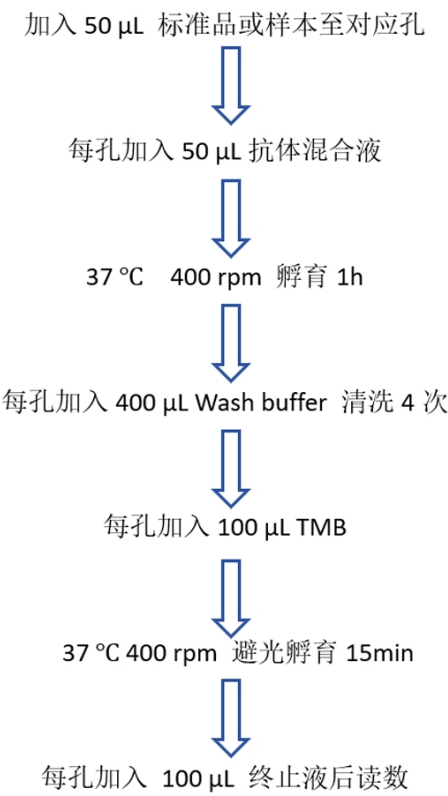
8.5 显色:每孔加TMB显色液100  $\mu$ L,恒温振荡器上37°C 400 rpm 孵育15-20 min(如果颜色偏浅,可适当延长显色时间,不超过30 min;保持显色底物始终处于避光状态,显色底物在加样前应是无色透明,如有变色,请勿使用);

8.6 终止:每孔加终止液100  $\mu$ 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;

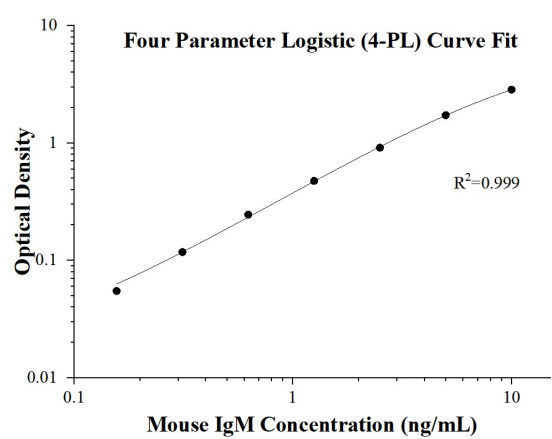
8.8 数据分析:每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值,设置复孔,取其平均值。以标准品的浓度为横坐标,OD值为纵坐标,使用专业软件(如Origin、ELISACalc等)进行四参数拟合(4-PL),根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度,乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

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       | 0.0116<br>0.0113 | 0.0115  | -         |
| 0.156   | 0.0657<br>0.067  | 0.0664  | 0.0549    |
| 0.313   | 0.1303<br>0.1282 | 0.1293  | 0.1178    |
| 0.625   | 0.2609<br>0.2534 | 0.2572  | 0.2457    |
| 1.25    | 0.4927<br>0.4821 | 0.4874  | 0.4760    |
| 2.5     | 0.9369<br>0.9135 | 0.9252  | 0.9138    |
| 5       | 1.7096<br>1.7732 | 1.7414  | 1.7300    |
| 10      | 2.8552<br>2.8685 | 2.8619  | 2.8504    |

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  | 5.21        | 0.24 | 4.61    | 1            | 16 | 5.55        | 0.62 | 11.17   |
| 2           | 8  | 1.30        | 0.03 | 2.31    | 2            | 16 | 1.35        | 0.08 | 5.93    |
| 3           | 8  | 0.65        | 0.05 | 7.69    | 3            | 16 | 0.66        | 0.05 | 7.58    |

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IgM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 | 1:80000  | 97      | 89-105 |
|      | 1:160000 | 102     | 99-105 |

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IgM的浓度。

| 样本类型        | 平均值 (ug/mL) | 范围 (ug/mL)   |
|-------------|-------------|--------------|
| 小鼠血清 (n=16) | 92.39       | 65.17-113.45 |

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IgM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：  
(小鼠血清样本预先稀释20000倍。)

|      |        | 小鼠血清   |
|------|--------|--------|
| 1:2  | 均值 (%) | 100    |
|      | 范围 (%) | -      |
| 1:4  | 均值 (%) | 88     |
|      | 范围 (%) | 84-92  |
| 1:8  | 均值 (%) | 89     |
|      | 范围 (%) | 88-91  |
| 1:16 | 均值 (%) | 100    |
|      | 范围 (%) | 89-110 |

9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组小鼠IgM  
加入50 ng/mL以下细胞因子，无明显交叉反应

|        |        |
|--------|--------|
| Mouse: | Human: |
| IgG4   | IgM    |
| IgG2b  | IgG1   |
| IgG1   | IgG2   |
| IgG2C  |        |
| IgG2A  |        |

十：参考文献

1. Schroeder, H. W., Jr., & Cavacini, L. Methods in Molecular Biology. 2010. 602, 1–12.  
2. Heyman, B., & Shulman, M. J. Encyclopedia of Immunobiology. 2016. 2, 1–14.  
3. Sharp, T. H., et.al. Frontiers in Immunology. 2019. 10, 487.