

小鼠单抗分型试剂盒（ELISA 间接法）

产品编号：**8305I**

酶标板直接包被腹水、纯化抗体，或包被抗原与腹水和纯化抗体、培养上清反应，再与山抗小鼠 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM、IgA，孵育，洗去未结合的部分，再加 HRP 标记的兔抗山羊抗体，洗去未结合的部分后，加 ABTS 显色液，根据显色深浅判断检测结果。

小鼠单克隆抗体分型试剂用于定性检测小鼠单克隆抗体亚类。一般对检测结果可以直接解释，但由于某些样品的特殊性，需要谨慎解释实验结果。

本试剂盒可用于检测腹水、培养上清或纯化抗体。

规格

96T，可检测 12 个样品

运输、储存和有效期

冷藏运输，2-8°C 储存，避光，在有效期内使用。正常储存条件下自生产之日起有效期 1 年。

试剂盒组成

1. 酶标板 96 孔，1 块（全新未包被）
2. PBS, 50ml（用于稀释抗原和样品）
3. 山羊抗小鼠免疫球蛋白抗体：A:山羊抗小鼠 IgG1, 1.3ml; B:山羊抗小鼠 IgG2a, 1.3ml; C:山羊抗小鼠 IgG2b, 1.3ml; D:山羊抗小鼠 IgG3, 1.3ml; E:山羊抗小鼠 IgM, 1.3ml; F:山羊抗小鼠 IgA, 1.3ml; G: 阴性对照, 1.3ml; H: 阳性对照: 1.3ml

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A(mIgG1)	紫	紫	紫	紫	紫	紫	紫	紫	紫	紫	紫	紫
B(mIgG2a)	绿	绿	绿	绿	绿	绿	绿	绿	绿	绿	绿	绿
C(mIgG2b)	深紫											
D(mIgG3)	浅紫											
E(mIgM)	黄	黄	黄	黄	黄	黄	黄	黄	黄	黄	黄	黄
F(mIgA)	蓝	蓝	蓝	蓝	蓝	蓝	蓝	蓝	蓝	蓝	蓝	蓝
G(Control-)	黄	黄	黄	黄	黄	黄	黄	黄	黄	黄	黄	黄
H(Control+)	红	红	红	红	红	红	红	红	红	红	红	红

图：1~12 列为 1~12 号样品，A~H 行为不同亚类或阴阳性对照

4. 兔抗山羊-HRP(11ml 直接使用)
5. 20X 洗涤液(25ml, 稀释后使用)
6. ABTS 显色液(11ml 直接使用)
7. ABTS 终止液(11ml 直接使用)

自备试剂和设备

1. 酶标仪，可以检测 405 nm/450 吸光度，也可肉眼观察
2. 能够吸取 0.5~10 μl, 10~200 μl, 100~1000 μl 的移液器
3. 吸取 1~25ml 的移液器或/和移液管
4. 1000ml 量筒
5. 吸水纸
6. 蒸馏水或去离子水
7. 配制稀释样品的试管。

地址：北京市昌平区阳坊镇极东未来产业园新业一楼三层 3096 号



实验准备

1. 将试剂从冰箱取出，平衡至室温 18~25 °C。
2. 1X 洗涤液的配制：20X 浓缩洗涤液（25ml）加去离子水稀释至 500ml 混匀，未用完的部分冷藏储存。冷藏的 20X 浓缩洗涤液可能有结晶，平衡至室温后结晶消失，摇匀取部分稀释或一次性稀释完毕。

操作步骤

包被腹水或纯化抗体，此方法适合于腹水和纯化抗体检测，不适合培养上清或浓缩培养上清的检测

1. 用 PBS 稀释腹水或纯化单抗，腹水 1:5000 稀释，纯化抗体稀释到 2 μ g/ml，每份样品稀释 1.0ml（复孔检测需要 2.0ml）。
腹水稀释方法：1:100 稀释，取 990ul PBS 加 10ul 腹水；再取 980ul 的 PBS，加 20ul 的 1:100 稀释腹水。
2. 根据需要，取出相应条数的板条，1 个样品需要 1 条（单孔）或 2 条（复孔）微孔板。
3. 在板条上标记好样品号，将样品加入对应的板条中，每孔 100ul。用封板膜封板，37°C 孵育 1 小时。
4. 甩去孔中的液体，在纸巾上拍干。
5. 用排枪加入洗涤液（可用酶标洗板机），每孔 300 μ l，静置 1 分钟，甩干，在纸巾上拍干，此步骤重复 3 次。
6. 将分型抗体 A~F 分别加入 A~F 孔，每孔 100ul，G 孔加阴性对照，H 孔加阳性对照，用封板膜封板，室温孵育 30 分钟。
7. 重复步骤 4~5。
8. 在每孔中加入 HRP 标记的兔抗山羊 IgG，每孔 100 μ l，用封板膜封板，室温孵育 15 分钟。
9. 重复步骤 4~5。
10. 在每孔中加入 ABTS 显色液 100ul，轻轻振荡，避光室温孵育 5~15 分钟（根据显色情况适当延长或缩短时间）
若仅需要肉眼观察，此步可以结束。如需要测定吸光度值，可继续以下步骤。
11. 在每孔中加入终止液 100ul，立即在酶标仪上读取 A_{405nm} ，参考波长 450nm。

包被抗原，此方法适用于检测腹水、培养上清、浓缩培养上清和纯化抗体

1. 用 PBS 稀释抗原，浓度 2 μ g/ml，小分子抗原需要与载体链接。
2. 根据需要，取出相应条数的板条，1 个样品需要 1 条（单孔）或 2 条（复孔）微孔板。在板条上标记好样品号，将稀释好的抗原加入到板条孔中，每孔 100ul。用封板膜封板，37°C 孵育 1 小时。
3. 甩去孔中的液体，在纸巾上拍干。
4. 用排枪加入洗涤液（可用酶标洗板机），每孔 300 μ l，静置 1 分钟，甩干，在纸巾上拍干，此步骤重复 3 次。
5. 将腹水或纯化抗体或浓缩培养上清用 PBS 稀释，未浓缩培养上清直接使用，腹水 1:5000 稀释，纯化抗体稀释到 1 μ g/ml，每份样品稀释 1.0ml（复孔检测需要 2.0ml）。
腹水稀释方法：1:100 稀释，取 990ul PBS 加 10ul 腹水；再取 980ul 的 PBS，加 20ul 的 1:100 稀释腹水。

将培养上清、稀释的腹水、纯化抗体或浓缩培养上清加入相应样品号的板条中，每孔 100ul，封板膜封板，室温孵育 2 小时。

6. 重复步骤 3~4。

7. 将分型抗体 A~F 分别加入 A~F 孔，每孔 100ul，G 孔加阴性对照，H 孔加阳性对照，用封板膜封板，室温孵育 30 分钟。

8. 重复步骤 3~4。在每孔中加入 HRP 标记的兔抗山羊 IgG，每孔 100 μ l，用封板膜封板，室温孵育 15 分钟。

9. 重复步骤 3~4。在每孔中加入 ABTS 显色液 100ul，轻轻振荡，避光室温孵育 5~15 分钟（根据显色情况适当延长或缩短时间）。

若仅需要肉眼观察，此步可以结束。如需要测定吸光度值，可继续以下步骤。

10. 在每孔中加入终止液 100ul，立即在酶标仪上读取 A_{405nm} ，参考波长 450nm。

结果解释：

G 为强阳性，或 H 为阴性或弱阳性，试剂操作顺序或加样错误，也可能试剂失效。

G 为阴性对照微弱颜色或无色，H 为阳性对照，呈强显色可以做进一步的分析。

问题	可能原因	解决办法
A~F 均不显色或显色弱	待测抗体浓度过低	提高样品的抗体浓度
	杂交瘤未分泌抗体	检查抗体分泌
A~F 多孔强显色	样品中不是单克隆	重新克隆
	腹水中含有宿主来源的抗体	使用纯化样品，进一步稀释腹水使污染物进一步稀释，或者改用包被抗原的间接法检测
	样品中的过高浓度抗体可能与分型特异性抗体或二抗有交叉反应	进一步稀释样品
	洗板不正确	正确洗板
	IgG1 样品也被 IgG2a 测出阳性	忽略 IgG2a 信号，只考虑 IgG1 信号
	样品被 IgG1 特异性抗体标记，也被另外一种分型抗体标记（特别是腹水）	忽略 IgG1 信号，因为属于宿主来源的抗体