

HBsAgGi ELISA 试剂盒 (96 Test)



RCMG Inc.

2-1-6 Sengen, Plaza Suite 106, Tsukuba, Ibaraki 305-0047, Japan

Phone: +81-29-828-8010

Website: <https://med-glycosci.com>

Email: marketing@medglyco.com

目录

1.产品说明	2
2.关于HBsAgGi ELISA的试剂	2
3.摘要	2
4.原理	3
5.操作流程	3
6.浓度计算	5
7.性能特点	5
8.注意事项	6
9.贮存和稳定性	6
10.参考文献	6

1. 产品说明

HBsAgGi ELISA 试剂盒是一种酶联免疫吸附试验,用于定量检测含有 O-糖基化 M-HBsAg 的 HBV 颗粒。仅供研究使用,不能用于诊断。

2. 关于 HBsAgGi ELISA 的试剂

2.1 本试剂盒包含的材料

1. HBsAgGi 抗体涂层板: 96 孔(一条 8 孔 x 12)
2. M-HBsAg 标准品 (800 ng/ml): 1 mL (2 mL 试管)
3. 稀释缓冲液: 24 mL (12 mL x 2 瓶)
4. HRP 标记的 HBsAgGi 抗体: 11 mL
5. 20X 洗涤缓冲液: 50 mL
6. TMB 底物: 12 mL
7. 反应终止液 (0.2 M 硫酸): 12 mL
8. 封板条: 3
9. 用户指南

2.2 需要但试剂盒不包含的材料和设备

1. 酶标仪: 450 nm
2. 洗板机
3. 微孔板震荡器(如果有的话)
4. 试剂槽
5. 微量移液枪 (20 μ L, 200 μ L, 1000 μ L)
6. 多通道移液枪
7. 一次性微量试管和枪头
8. 蒸馏水

3. 摘要

构成 HBV 颗粒包膜的 HBs 抗原由三种不同大小的糖蛋白组成 (S-HBs 抗原、M-HBs 抗原和 L-HBs 抗原), 并且具有 HBV DNA 或 HBV RNA 的传染性 HBV 颗粒都具有 HBs 抗原。另一方面, HBV 感染者的血液中含有许多不具传染性的亚病毒颗粒, 而这些亚病毒颗粒主要由 S-HBs 抗原组成。本试剂盒中使用的抗 HBV 表面抗原糖基化异构体抗体 (HBsAgGi) 对 C 型基因具有特异性, 主要与感染性 HBV 颗粒结合。

4. 原理

本产品采用 ELISA 夹心法检测 HBV。一种抗 HBV 表面抗原糖基化异构体的抗体 (HBsAgGi) 被固定在微孔上。HBV 颗粒和标准品可被 HBsAgGi 抗体捕获 (STEP 1)。洗涤后, ELISA 微孔上捕获的 HBV 颗粒将与过氧化物酶结合的抗体 (HRP 标记的 HBsAgGi) 进一步反应 (STEP 2)。进一步清洗后, 将 HRP 底物 (TMB 底物) 加入孔中。孵育结束后, 加入反应终止液终止反应, 用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度 (STEP 3)。样品中的 M-HBsAg 蛋白浓度将通过使用测量不同浓度的标准物质 (试剂盒中的 M-HBsAg 蛋白) 而制备的标准曲线来计算。

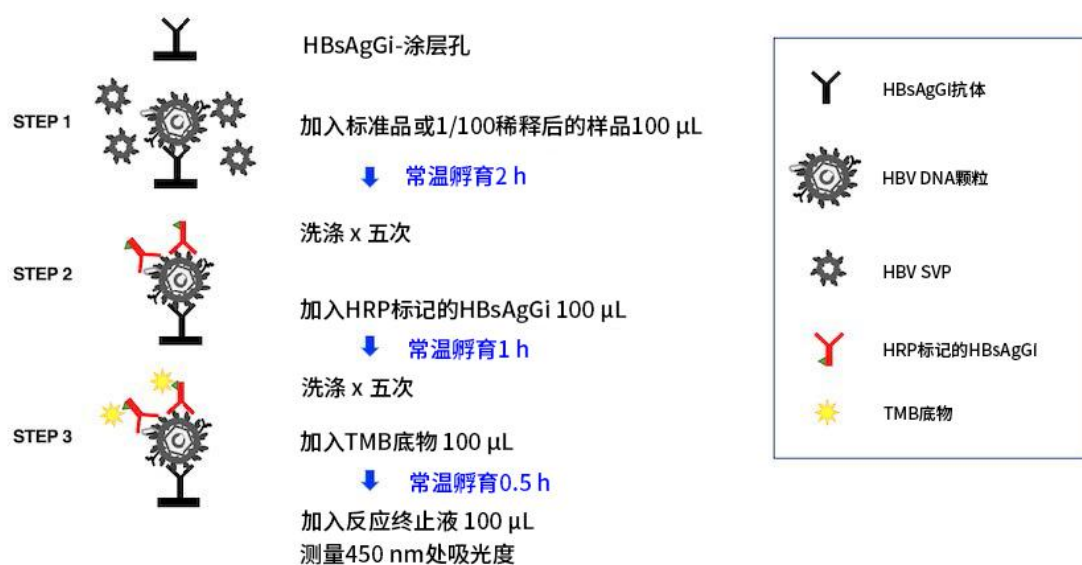


图1 HBsAgGi ELISA 试剂盒操作流程图

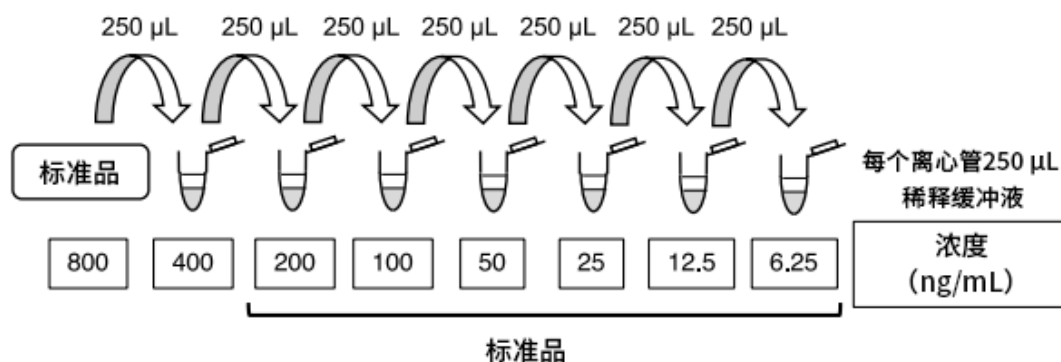
5. 操作流程

5.1 准备工作

- 1) 运用本检测法对细胞培养上清液、血清和血浆进行检测。血清样本应按常规方法收集, 并在收集后于 4°C 存放, 1 周内进行检测。如果长时间储存, 样品需要分装以及必须在 -20°C 或以下的温度下冷冻保存, 并避免反复冻融。在检测前, 冷冻样品需要先静置至室温。当样品有可见沉淀物时, 必须在检测前进行澄清。
- 2) 将 50 mL 20X 洗涤缓冲液与 950 mL 纯水混合, 制备 1X 洗涤液。混合均匀后, 转移到一个干净的瓶子里, 在 4-30°C 下保存。1X 洗涤液可稳定保存 30 天。

5.2 标准品的制备

准备 7 个微量离心管, 分别标记为 400 ng/mL, 200 ng/mL, 100 ng/mL, 50 ng/mL, 25 ng/mL, 12.5 ng/mL, 6.25 ng/mL。每个离心管分别加入 250 μL 的稀释缓冲液。稍微离心一下试剂盒中的 M-HBsAg 标准品 (800 ng/mL) 的离心管。取 250 μL M-HBsAg 标准品加入 400 ng/mL 的离心管中并混合。接下来, 从 400 ng/mL 离心管中取 250 μL, 加入 200 ng/mL 离心管中并混合。以同样的方式进行 2 倍的连续稀释直至 6.25 ng/mL。



5.3 样品稀释的方法

血清样品需要用稀释缓冲液稀释100倍;对于重复检测(推荐),在稀释试管中加入217.8 μL稀释缓冲液,加入2.2 μL样品,并混合。

5.4 试剂的制备

- 1) 检测用的抗体: HRP 标记的 HBsAgGi 抗体不应被稀释使用。对于剩余的 HRP 标记的 HBsAgGi 抗体,紧闭密封试管并在 2-8°C下保存。
- 2) TMB 底物: 从冰箱中取出并使之达到室温后,可直接使用。
- 3) 反应终止液: 从冰箱中取出并使之达到室温后,可直接使用。

5.5 检测实验方案

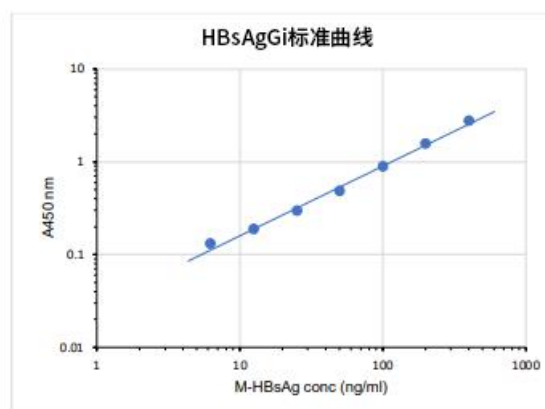
- 1) 计算样品检测所需的微孔板条以及标准品和空白对照的微孔数。每个样品、标准品和空白对照都应进行两次重复的检测(推荐)。剩余的微孔板条应放回提供的袋子里,必须小心地重新密封以避免吸湿,并储存在 2-8°C。
- 2) 标准品: 在微孔板条的两个孔中加入 100 μL 稀释缓冲液(空白标准)作为空白对照。以同样的方式,分别在每个浓度标准品的两个孔中加入 100 μL,从 6.25 ng/mL 到 200 ng/mL 的标准品。(100 μL/well)。
- 3) 样品: 将 100 μL 经稀释缓冲液稀释 100 倍的样品加入两个孔中(100 μL/well)。
- 4) 第一次孵育: 在所有添加完成后,密封微孔板条并在室温下孵育 2 h。如果可能,建议轻轻摇动微孔板条(大约 400rpm/min)。
- 5) 洗涤: 小心地取下封板条,清空孔洞。用洗涤缓冲液(350 μL/well)清洗微孔板条 5 次。
- 6) HRP 标记的 HBsAgGi 抗体: 将 100 μL HRP 标记的 HBsAgGi 加入所有孔中,包括空白对照孔。
- 7) 第二次孵育: 密封微孔板条并在室温下孵化 1 h。如果可能,推荐轻轻摇动微孔板条(大约 400rpm/min)。
- 8) 洗涤: 小心地取下封板条,清空孔洞。用洗涤缓冲液(350 μL/well)清洗微孔板条 5 次。
- 9) HRP 反应: 将足够用于检测量的 TMB 底物存放在足够大小的储液器中。使用多通道移液枪,在所有孔中加入 100 μL TMB 底物,并在室温下孵育板条 30 min。应监测孔的发色,并在适当的时机停止反应。
该反应将呈现蓝色。停止孔的反应时,空白应为透明,25 ng/ml 左右为浅蓝色,200 ng/ml 为深蓝色。
- 10) 终止反应: 使用多通道移液器从存放有足够终止液的储液器中向每个孔中加入100 μL的终止液。轻轻摇动微孔板条,混合溶液停止反应。加入终止液后,孔的颜色将从蓝色变为黄色。注意:终止液是0.2 M H₂SO₄, 请慎重使用。
- 11) 检测: 停止反应后,在15 min内用平板阅读器在450 nm处读取每个微孔的吸光度。可以选择读取620 nm处的吸光度作为参考波长。测定样品和标准品(包括空白对照)的吸光度。

注意:在使用摇床培养的情况下,获得的数值可能高于不摇床获得的数值。

6. 浓度计算

- 1) 计算每个浓度的标准 M-HBsAg 与 HBsAgGi 抗体反应的平均吸光度。
- 2) 标准品浓度为横轴,450 nm 吸光度为对数图的纵轴上,制备标准曲线
- 3) 根据上述标准曲线图,从每个样品的吸光度读数中计算出 M-HBsAg 的浓度。
- 4) 不能在标准曲线的范围之外进行定量。如果测量值接近标准曲线的上限(O.D. 450 值高于 2.0), 请稀释后再次测量, 得到 M-HBsAg 的量。
- 5) 图为 M-HBsAg 的标准曲线示例。

标准品浓度 (ng/mL)	O.D. 450
0 (空白对照)	0.078
6.25	0.132
12.5	0.188
25	0.294
50	0.482
100	0.89
200	1.565
400	2.747



7. 性能特点

7.1 灵敏度

M-HBsAg 的检测下限被确定为 0.89 ng/mL(由 10 次独立测量得到的平均值加 3 个标准偏差)。

7.2 可重复性(批内)

通过对 6 个重复的血清样本进行检测, 确定了检测的批内重复性。在同一平板上使用已知浓度的 3 个样品, 变异系数(C.V.) 值小于 10%。

样品	血清 1	血清 2	血清 3
检测数量	6	6	6
平均值 (ng/mL)	110.4	45	89.2
C.V. (%)	1.82	2.52	2.65

8. 注意事项

8.1 操作注意事项(危险预防)

- 1) 处理血清标本和样本时应注意它们的感染性。为了避免感染的风险,在测量时应采取保护措施,如安全柜、手套、白大褂、护目镜和口罩。
- 2) 本试剂盒含有作为防腐剂的叠氮化钠。如果试剂不小心进入眼睛或嘴里,或接触到皮肤,请采取急救措施,如用清水彻底冲洗,必要时应寻求医疗救助。
- 3) 由于本试剂盒中含有硫酸作为反应停止液,如果不小心进入眼睛或嘴里,或附着在皮肤上,请采取急救措施,如用水彻底冲洗,必要时应寻求医生救助。

8.2 一般预防措施

- 1) 应使用指定的标准品(重组 M-HBsAg 标准品)和稀释的标准品来制备标准曲线。
- 2) 稀释样品时应使用指定的样品稀释剂。
- 3) 应为每次样品测量准备一条标准曲线。
- 4) 试剂开封后应立即使用,并在 2-8°C 下盖上盖子储存。
- 5) 试剂应在规定的条件下储存,过期后不得使用。
- 6) 本试剂盒仅用于研究用途,不应用于规定以外的任何目的。

8.3 废弃处理注意事项

- 1) 血清样品和样品应作为有潜在传染性的样品处理,并采取预防措施,包括处理用过的针头、板和废液。
- 2) 用于样品的枪头用次氯酸钠消毒(在 1% 有效浓度的环境中浸泡至少 1 h)。使用高压灭菌(121°C,至少 20 min)对枪头、平板和废液进行消毒。
- 3) 废液应按照相关法规进行处理。
- 4) 由于稀释缓冲液中含有作为防腐剂的叠氮化钠,所以废液应该由专门的废液处理公司来处理。
- 5) 废料(用过的塑料制品)应该由专门的废品处理公司作为化学附着物进行处理。
- 6) 样品应在安全柜中处理,但如果样品不小心散落或被污染,则用纸巾擦拭,然后用次氯酸钠(有效浓度: 1%)擦拭消毒。

9. 贮存和稳定性

除反应终止液外,所有试剂盒成分必须储存在 2-8°C。所有的试剂在生产后的 12 个月内,在指定的条件下储存是稳定的。

10. 参考文献

1. Schmitt et al. Structure of pre-S2 N- and O-linked glycans in surface proteins from different genotypes of hepatitis B virus. (2004) J Gen Virol 85:2045-2053.
2. Dobrica et al. N-Glycosylation and N-Glycan Processing in HBV Biology and Pathogenesis. (2020) Cells 9:1404.

3. Angata et al. O-glycosylated HBsAg peptide can induce specific antibody neutralizing HBV infection. (2021) Biochim Biophys Acta Gen Subj. 1866:130020

制造商

RCMG Inc,
2-1-6 Sengen, Plaza Suite 106, Tsukuba,

茨城县 305-0047, 日本

富士胶片 and 光 (广州) 贸易有限公司

广州市越秀区先烈中路69号东山广场30楼3002-3003室
北京 Tel: 13611333218 上海 Tel: 021 62884751
广州 Tel: 020 87326381 香港 Tel: 852 27999019
询价: wkgz.info@fujifilm.com
官网: labchem.fujifilm-wako.com.cn

官方微信



目录价查询



2211RCAU01