

产品信息 (Product Details)

产品概述 (Summary)

产品名称 (Product name)	2019-nCoV Surrogate Virus Neutralization Test Kit(K417N,E484K,N501Y)
货号 (Catalog#)	ATK00018
描述 (description)	SARS-CoV-2 Surrogate Virus Neutralization Test Kit(K417N,E484K,N501Y)基于中和抗体ELISA检测的原理，可以检测血清或血浆中抗SARS-CoV-2病毒的中和抗体浓度，这种抗体可以阻断RBD(K417N,E484K,N501Y)和ACE2之间的相互作用，该试剂盒包含两个关键成分：HRP标记的重组人ACE2蛋白和SARS-CoV-2病毒RBD(K417N,E484K,N501Y)蛋白。

本试剂盒用于测定血清或血浆样本 RBD(K417N,E484K,N501Y)中和抗体的浓度。

运输方式 (Shipping)

蓝冰运输。

稳定性&储存 (Stability &Storage)

收到试剂盒后请将阳性对照、阴性对照、检测溶液 A 以及预包板保存于-20℃，封板膜放置于常温保存,其余试剂请置于 4℃保存备用。

试剂盒按推荐温度保存6个月，信号强度降低小于 10%。

使用方法 (Standard Operating Procedure) 所需设备及试剂

450 nm滤光片酶标仪，含540 nm或570nm校正波长更佳

单道或多道微量移液器，移液器枪头

去离子水

500 mL量筒

样品稀释管或不同规格EP管

吸水纸

一、样品收集与储存

处理所有的血液和血清，请按照NCCLS提供的处理和储存血清和血浆样本的建议 (1990年

H18-A批准的血液样本处理和标准程序)。

血清样本：全血室温放置60分钟或4℃过夜，然后1000 x g离心15分钟，取上清检测，或分

2019-nCoV Surrogate Virus Neutralization Test Kit(K417N, E484K,N501Y)

装后于 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存，避免样品反复冻融。

血浆：使用EDTA、肝素或柠檬酸盐作为抗凝剂收集血浆，样品采集后30分钟内

1000 x g离心

15分钟，取上清检测，或分装后于 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存，避免样品反复冻融。

二、试剂准备

使用前将所有试剂和样本置于室温平衡。

20 \times 浓缩清洗液：如果浓缩清洗液中有晶体析出，平衡至室温并摇匀，直到晶体完全溶解，25mL浓缩清洗液使用去离子水定容至500mL，得到清洗液。

待测样本：将待测样本用样本稀释液按照体积比1:9稀释，例如10 μL 样本加入90 μL 样本稀释液。

阳性对照：临用前震荡混匀后用掌上离心机瞬时离心，使液体集中于管底，使用样本稀释液

1:100稀释至工作浓度。

阴性对照：临用前震荡混匀后用掌上离心机瞬时离心，使液体集中于管底，使用样本稀释液1:10稀释至工作浓度。

检测溶液A (HRP标记)：临用前震荡混匀后用掌上离心机瞬时离心，使液体集中于管底，使用检测溶液稀释液1:2000稀释至工作浓度。

显色液：避光保存，显色时100 μL /孔。室温下孵育8~10分钟。

终止液：显色完毕后50 μL /孔。

三、实验步骤

使用前将所有试剂和样本置于室温，建议对所有标准品、对照品和样本进行一式两份的分析。

1. 按照前面章节的指示准备所有试剂和样本。

2. 从板架上取下多余的微孔板条，将其放回装有干燥剂包的铝箔袋中，然后重新密封保存于 -20°C 。

3. 将稀释的阳性对照、阴性对照和待测样本分别与检测溶液A按照 1:1等体积混合。

例如，将100 μL 阳性对照与100 μL 检测溶液A混合，该步骤可在96孔PCR板或者96孔Elisa板中进行。

2019-nCoV Surrogate Virus Neutralization Test Kit(K417N,

E484K, N501Y)

4. 将阳性对照混合物、阴性对照混合物和待测样本混合物各100μL添加到对应的酶标板孔中，用封板膜盖好，37°C孵育1小时。
5. 弃去孔内液体，每孔加入 300μL的清洗液，轻微震荡后弃去孔内液体，将酶标板倒扣在吸水纸上轻拍，使残留在孔内的液体全部去除，重复洗板 5 次，此过程也可采用尖嘴喷射瓶，多道移液器或自动洗板机来完成。
6. 每孔加入100μL显色液，37°C避光显色8-10分钟。
7. 每孔加入50μL终止液，孔里的颜色应该由蓝色变至黄色，如果孔内颜色为绿色或颜色变化不均匀，轻轻震动酶标板使颜色均一。
8. 擦干酶标板底部水气，立刻用酶标仪在 450nm 波长测量各孔的O.D.值，如果波长校正可用，则设置为540 nm或570 nm，如果波长校正不可用，则从450 nm的读数中减去540 nm或570 nm的读数，这种修正可去除酶标板读数中的光学偏差，如果没有校正波长，可直接读取450 nm的读数，但读值有可能不准确。

四、结果判读

为确保结果的有效性，每次检测必须包括阳性和阴性对照，阳性对照和阴性对照检测OD450必须在下表所列的范围内，如果OD450值不符合下表要求，则试验无效，必须重复进行。

项目	OD450值	结果判断
阳性对照	< 0.3	通过
阴性对照	> 0.9	通过

用抑制率来判定样本中抗SARS-CoV-2中和抗体的水平，判定公式如下：

$$\text{抑制率} = \left(1 - \frac{\text{样本 OD 值}}{\text{阴性对照 OD 值}}\right) * 100\%$$

五、判定阈值

项目	阈值	结果	检测结果判读
中和抗体检测	≥20%	阳性	检测到中和抗体
	< 20%	阴性	未检测到中和抗体

六、精密度

批内差：CV<8%

批间差：CV<10%

2019-nCoV Surrogate Virus Neutralization Test Kit(K417N, E484K,N501Y)

七、稳定性

试剂盒按推荐温度保存6个月，信号强度降低小于 10%。

八、实验细节说明

1. 在试剂盒标签上的有效期内使用，不要与其他厂家的试剂盒混合使用。
2. 如果阴性对照或阳性对照检测OD值超出检测范围，可适当缩短显色时间。
3. 为避免交叉污染，不同标准品、样本、试剂的加样需更换移液枪头，每管试剂使用单独的容器储存。
4. 在孵育过程中贴紧封板膜。
5. 显色液避光保存，临用前15分钟从冰箱取出室温平衡。
6. 浓缩清洗液 (20×) 需使用去离子水1 : 20稀释至工作浓度，去离子水不包含在试剂盒中，需实验人员自备。
7. 终止液为酸性溶液，具有轻微腐蚀性，使用时避免接触皮肤、眼、耳、口等暴露部位，如不慎接触，使用大量清水冲洗后观察接触部位反应，如情节严重请及时就医。
8. 试剂盒酶标板条可按需拆卸使用，已开封的试剂盒建议在1个月内使用，未开封的试剂盒所有试剂均按试剂瓶标签上所示保存，收到试剂盒后请将阴性对照、阳性对照、检测溶液 A 以及 96 孔板保存于-20℃，其余试剂请置于 4℃保存备用。

九、常见问题解决指南

问题	可能原因	解决方案
阳性质控读数低或者异常	检测溶液A和预包板失活	a. 增加反应时间或检测试剂浓度以补偿可能丧失的活性
	仪器设置错误	a. 检查仪器设置
		b. 提前一小时预热酶标仪
	加样错误	a. 检查加样步骤
	试剂过早提前准备	a. 确保工作液现配现用
	温度不稳定	a. 孵育时间和温度参见说明书，避免反复冻融
		a. 加入空白孔

2019-nCoV Surrogate Virus Neutralization Test Kit(K417N,

读数背景高	样品中含有抑制剂	b.	保证DMSO < 1%
	洗涤不完全	a.	增加洗涤次数和洗液量
	缓冲液样品污染、降解	a.	确保正确准备，使用和存储了缓冲液和样品
读数不稳定	移液或稀释方法不一致	a.	校正移液器
		b.	准备预混液以减少移液不一致
		c.	设置平行孔以获得更准确的结果
	孔中有气泡	a.	轻震酶标板以去除气泡
	读数过高	a.	调整样品浓度以达到最佳信号强度。
b.		孵育时间调整至45分钟	
试剂和样品混合不充分	a.	确保试剂与样品完全混合	
显色不完全	缓冲液残留或污染	a.	<p>阴性对照中的颜色应在添加TMB底物后10秒钟内出现。</p> <p>如未按上述时间显色可考虑以下情况：</p> <p>a.在添加TMB之前确保没有污染或残留的缓冲液</p> <p>b.延长TMB孵育时间到15分钟</p>

组分和说明 (Component and Instruction)

样品名称	规格	描述	推荐储存条件
预包板	1 板	96孔聚苯乙烯微孔板 (12列*8孔) , 预包被RBD(K417N,E484K, N501Y)蛋白。	密封状态放置于-20 °C保存。

2019-nCoV Surrogate Virus Neutralization Test Kit(K417N,

E484K,N501Y)

阳性对照	1 管	12 μ L /管阳性对照，临用前用样本稀释液1:100 稀释至工作浓度。	放置于-20 $^{\circ}$ C保存。
阴性对照	1 管	60 μ L /管阴性对照，临用前用样本稀释液1:10 稀释至工作浓度。	放置于-20 $^{\circ}$ C保存。
检测溶液A	1 管	12 μ L/管-HRP标记 ACE2 蛋白（含防腐剂），临用前用检测溶液稀释液1:2000稀释至工作浓度。	放置于-20 $^{\circ}$ C保存。
样本稀释液	1 瓶	25 mL稀释液（含防腐剂），用于待测样本的稀释。	放置于4 $^{\circ}$ C保存。
检测溶液稀释液	1 瓶	25 mL稀释液（含防腐剂），用于检测溶液A的稀释。	放置于4 $^{\circ}$ C保存。
浓缩清洗液	1 瓶	25 mL（20 \times ）浓缩清洗液（含防腐剂），临用前用去离子水1:20 稀释至工作浓度。	放置于4 $^{\circ}$ C保存。
显色液	1 瓶	12 mL TMB（四甲基联苯胺）。	放置于4 $^{\circ}$ C保存。
终止液	1 瓶	6 mL 。	放置于4 $^{\circ}$ C保存。
封板膜	3 片	用于实验中封闭酶标板。	放置于常温保存。

Note

For research use only .