

产品信息 (Product Details)

产品概述 (Summary)

产品名称 (Product name)	2019-nCoV Surrogate Virus Neutralization定量试剂盒
货号 (Catalog#)	ATK00021
描述 (description)	<p>本试剂盒基于中和 ELISA 分析技术，将 RBD 蛋白预先包被在酶标板上，之后将阳性对照标准品、阴性对照和分析样本分别加入到微孔中反应，再加入HRP标记的ACE2蛋白，样本中的RBD中和抗体会阻断RBD和ACE2之间的相互作用，清洗掉未结合的试剂，将显色底物溶液添加到微孔中显色，显色强度与样本中的RBD中和抗体浓度成反比。</p> <p>本试剂盒用于测定血清和血浆样本RBD中和抗体的浓度。</p>

运输方式 (Shipping)	蓝冰运输。
稳定性&储存 (Stability &Storage)	<p>收到试剂盒后请将标准品、检测溶液 A、阳性对照、阴性对照以及预包板保存于-20°C，封板膜放置于常温保存,其余试剂请置于 4 °C保存备用。</p> <p>试剂盒按推荐温度保存6个月，信号强度降低小于 10%。</p>

使用方法 (Standard Operating Procedure)	<p>所需设备及试剂</p> <p>450 nm滤光片酶标仪，含540 nm或570nm校正波长更佳</p> <p>单道或多道微量移液器，移液器枪头</p> <p>去离子水</p> <p>500 mL量筒</p> <p>样品稀释管或不同规格EP管</p> <p>吸水纸</p> <p>微孔板振荡仪 (可选)</p> <p>一、样品收集与储存</p> <p>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)。</p>
---------------------------------------	---

2019-nCoV Surrogate Virus Neutralization定量试剂盒

- 1.血清样本：全血室温放置60分钟或4°C过夜，然后1000 x g离心15分钟，取上清检测，或分装后于≤-20°C冰箱保存，避免样品反复冻融。
- 2.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≤-20°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。

- 1.20×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，得到清洗工作液。
- 2.血清、血浆样本：推荐血清，血浆使用样本稀释液 1:9稀释后上样，例如10μL样本加入90μL样本稀释液。如果样本检测值超出标准曲线范围，可适当调整稀释倍数并重新测定，或预估样本中抗体浓度，在实验之前预先稀释数个梯度同时进行测定。
- 3.标准品工作液：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稀释得到第一个标准点10ug/mL，依次进行倍比稀释操作得到共计7个标准点 10μg/mL、5μg/mL、2.5μg/mL、1.25μg/mL、0.625μg/mL、0.3125μg/mL、0.15625μg/mL，最后再以阴性对照工作液为零标准（0 μg/mL），共计8个标准点，建议每个标准点至少做2个平行孔。
- 4.阴性对照工作液：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1:9稀释至工作浓度，例如10μL阴性对照加入90μL样本稀释液。
- 5.检测溶液A工作液：检测溶液A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。
- 6.显色液：避光保存，显色时100μL /孔。
- 7.终止液：显色完毕后50μL /孔。

三、实验步骤

2019-nCoV Surrogate Virus Neutralization定量试剂盒

使用前将所有试剂和样本置于室温，建议对所有标准品和待测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. 每孔分别加入50μL稀释好的标准品工作液、阴性对照工作液和待测样本，用封板膜封住，37°C孵育30分钟。
4. 每孔分别加入50μL稀释好的检测溶液A工作液，用封板膜封住，使用微孔板振荡仪或手动轻微震荡5分钟后，37°C孵育1小时。
5. 弃去孔内液体，每孔加入 300μL的清洗工作液，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、标准曲线制作

取每个标准品、阴性对照、样本的复孔平均值 O.D.，然后计算抑制率，抑制率计算公式如下：

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

2019-nCoV Surrogate Virus Neutralization定量试剂盒

以标准品的浓度为横坐标，抑制率为纵坐标，选取抑制率在10%-90%区间的4-5点绘出标准曲线（R2值越趋近于1曲线越精确），然后再将待测样本的抑制率代入标准曲线的回归方程式计算出浓度，从标准曲线上计算出的浓度须乘以稀释倍数，即可计算出待测样本RBD中和抗体实际浓度。

如果样本检测值超出标准曲线范围，可适当调整稀释倍数并重新测定，或预估样本中抗体浓度，在实验之前预先稀释数个梯度同时进行测定。

五、标曲案例

标准曲线仅用于演示，每次实验均需生成单独的标准曲线。

标准点 (ug/ml)	O.D.	抑制率
10	0.06	97.08%
5	0.11	94.41%
2.5	0.29	85.18%
1.25	0.84	56.44%
0.625	1.44	25.53%
0.3125	1.76	9.04%
0.15625	1.72	10.96%
阴性对照	1.94	/

六、检测范围

0.15625ug/mL—10ug/mL

七、精密度

批内差：CV<12%

批间差：CV<15%

八、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%。



九、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，收到试剂盒后请将阳性对照、阴性对照、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。

十、常见问题解决指南

问题	原因	解决方案
标准曲线差	移液不精确	检查和校正移液器
	标准品准备不正确	进行正确的标准品梯度稀释
O.D 值低	孵育时间太短	保证充足的孵育时间
	温度不正确	试剂平衡至室温并保证孵育温度正确

2019-nCoV Surrogate Virus Neutralization 定量试剂盒

	试剂体积不 确	检查移液器并确保加样体积 与说明书一致
精密度低	移液不精确	检查和校正移液器
	混匀不充分	充分混匀和吸取试剂
	洗涤不充分	按说明书要求充分洗涤和浸 泡
背景值高	洗涤不充分	按说明书要求充分洗涤和浸 泡
	清洗液污染	重新配置清洗液
灵敏度低	试剂盒储存不 当	试剂盒短期整体保存于4℃ ，长期保存根据说明书分开 保存各组分

组分和说明 (Component and Instruction)

样品清单及储存条件

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蛋白。	密封状态放置 于-20℃保 存。
阳性对照	1 管	12L重组人源RBD中和抗 体，浓度 1mg/mL,临用前用 样本稀释液配置7个标准点。	放置于-20℃ 保存。
阴性对照	1 管	60L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℃ 保存。
检测溶液A	1 管		放置于-20℃ 保存。

		12L 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。	
样本稀释液	1 瓶	25 mL稀释液(含防腐剂), 用于阳性对照、阴性对照、血清、血浆的稀释。	放置于4°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°C保存。
浓缩清洗液	1 瓶	25 mL (20×) 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°C保存。
显色液	1 瓶	12 mL TMB (四甲基联苯胺)。	放置于4°C保存。
终止液	1 瓶	6 mL 2M 酸液。	放置于4°C保存。
封板膜	4 片	用于实验中封闭酶标板。	放置于常温保存。

*在试剂盒保质期内使用

Note

For research use only .

