

新型冠状病毒(B.1.1.529)中和抗体滴度检测试剂盒(新冠RBD蛋白)

(酶联免疫分析法)

【产品名称】

新型冠状病毒(B.1.1.529)中和抗体滴度检测试剂盒(新冠RBD蛋白)

【货号】

RAS-N056

【规格】

96 Tests

【预期用途】

本试剂盒用于检测人血清样本中新型冠状病毒(B.1.1.529)中和抗体(Spike RBD)，适用于抗体定性检测和抗体滴度检测。

【检测原理】

本试剂盒应用竞争ELISA方法。微孔板预包被了Human ACE2 Protein，样本中的新型冠状病毒(B.1.1.529)中和抗体(Spike RBD)与微孔板上固定的Human ACE2 Protein特异性竞争HRP-SARS-CoV-2 Spike RBD(B.1.1.529)。用底物显色，随后用终止液终止，板孔中溶液会由蓝色变为黄色，使用酶标仪在450 nm和630 nm处测定样本吸光度值（OD_{450 nm}、OD_{630 nm}）。样本OD_{450 nm}-OD_{630 nm}与样本中新型冠状病毒(B.1.1.529)中和抗体(Spike RBD)的含量呈负相关。

【产品组份】

表1.产品组份

ID	组份名称	规格 (96 T)	物理状态	存储条件	
				未开启	已开启
RAS056-C01	Pre-coated Human ACE2 Microplate	1 plate	固体	2-8°C	2-8°C
RAS056-C02	Positive Control	100 µL	液体	2-8°C	2-8°C
RAS056-C03	Negative Control	100 µL	液体	2-8°C	2-8°C
RAS056-C04	HRP-SARS-CoV-2 Spike RBD(B.1.1.529)	15 µg	冻干粉	2-8°C,避光	-70°C,避光
RAS056-C05	10xWashing Buffer	50 mL	液体	2-8°C	2-8°C
RAS056-C06	Dilution Buffer	50 mL	液体	2-8°C	2-8°C
RAS056-C07	Substrate Solution	12 mL	液体	2-8°C,避光	2-8°C,避光
RAS056-C08	Stop Solution	7 mL	液体	2-8°C	2-8°C

【储存条件及有效期】

1. 未开封：试剂盒保存于2-8°C，试剂盒自生产之日起有效期为12个月，有效期见外包装盒标签。
2. 已开封：试剂盒开封后各组份按照表1存贮条件保存，有效期自开封之日起为30天，未使用完的微孔板条需与干燥剂一起密封保存。

注：不要使用过期试剂。

【需要但未提供的实验仪器与耗材】

1. 单道、多道微量移液器和移液器吸头：需满足10 µL、300 µL、1000 µL加样需求
2. 恒温培养箱
3. 酶标仪，含450 nm/630 nm波长
4. 离心管：1.5 mL，10 mL

5. 计时器
6. 试剂瓶
7. 超纯水或去离子水

【样本要求】

1. 热灭活：将样本置于56℃的水浴锅中加热30 min。

注：样本在 56℃下放置时间不得超过 1.0 h。

2. 平衡至室温：将样本放置在室温条件（20-25℃）下平衡30 min以上，并混合均匀。
3. 保存：样本如需保存，请将样本分装冻存于-20或-80℃冰箱，避免反复冻融。

注：a. 样本在用于本试验前必须进行热灭活。

b. 样本溶血会影响检测结果，溶血样本不适合用于本试剂盒的检测。

c. 未使用本试剂盒对人血浆或全血样本建立检测方法，建议使用者根据需要自行建立检测方法。

【试剂准备】

1. 使用前将所有试剂恢复至室温（20℃-25℃）。如果溶液中有晶体形成，需平衡溶液至晶体完全溶解（可将溶液放置于恒温培养箱37℃平衡10-15 min）。

2. 按照表2建议，将提供的HRP-SARS-CoV-2 Spike RBD(B.1.1.529)冻干品用超纯水/去离子水稀释为复溶液。冻干品复溶液使用前需在室温下平衡30 min，每隔10 min轻轻震荡摇匀。请勿剧烈摇动或涡旋。冻干品复溶液应在-70℃保存，冻融次数不要超过3次。

表2. HRP-SARS-CoV-2 Spike RBD(B.1.1.529)冻干品复溶液配制方法

ID	组份名称	规格 (96T)	复溶液浓度	重构水体积 Vol.
RAS056-C04	HRP-SARS-CoV-2 Spike RBD(B.1.1.529)	15 µg	100 µg/mL	150 µL

【检测流程】

1. 工作液配制

1.1 配制1×Washing Buffer: 取50mL 10×Washing Buffer, 用超纯水/去离子水稀释并定容至500 mL。

1.2 配制HRP- SARS-CoV-2 Spike RBD(B.1.1.529)工作液:

用Dilution Buffer将HRP-SARS-CoV-2 Spike RBD(B.1.1.529)冻干品复溶液稀释至2.0 µg/mL, 配制好的工作液需避光保存, 请现配现用。

1.3 配制Positive Control工作液和Negative Control工作液, 样本前处理:

a. **若用于抗体定性检测:** 将待检样本、Positive Control和Negative Control用Dilution Buffer稀释至1:10, 充分混合均匀。(待检样本、Positive Control、Negative Control与Dilution Buffer的体积比为1:9, 例如: 10 µL的待检样本+90 µL的Dilution Buffer)。

b. **若用于抗体滴度检测:** 建议将待检样本、Positive Control和Negative Control用Dilution Buffer从1:10-1:640进行稀释。

2. 编号

将稀释后的待检样品对应酶标板板孔进行编号, 每次实验需设置一组 Positive Control 工作液和 Negative Control 工作液。

3. 加样

在对应板孔内先加入 50 µL 稀释后的样本、Positive Control 工作液和 Negative Control 工作液, 然后每孔再加入 50 µL HRP-SARS-CoV-2 Spike RBD(B.1.1.529)工作液, 轻轻震荡混匀。此步骤需连续操作, 切勿间隔时间较长, 以免影响结果。

4. 孵育

用封板膜封板, 放置 37°C恒温培养箱孵育 1.0 h。

5. 洗板

小心揭开封板膜。弃去孔中液体，每孔加入 300 μ L 1 \times Washing Buffer，浸泡 30 s。共洗板 3 次。

6. 显色

将微孔板拍干，每孔加入 100 μ L Substrate Solution。用封板膜封板，放置 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱避光孵育 20 min。

7. 终止

每孔加入 50 μ L Stop Solution，轻轻震荡酶标板至混合均匀。

注：孔中液体由蓝色变为黄色。

8. 读数

用酶标仪测定各孔在 450 nm 和 630 nm 波长的吸光值，请在终止 3 分钟内读数。

注：各孔 OD_{450 nm} 扣除 OD_{630 nm} 读值可降低背景干扰。

9. 数据分析

若待检样本、Positive Control 和 Negative Control 是复孔或多孔加样，需计算 OD 平均值。请根据试剂盒说明书对读数结果的 OD 值进行数据分析。

【参考值】

1. 临界值（Cut-off）采用统计学方法进行确定，Cut-off=20%。

2. 样本抑制率计算公式：

$$\text{抑制率} = (1 - \text{样本 OD}_{450 \text{ nm}} - \text{OD}_{630 \text{ nm}} / \text{Negative Control OD}_{450 \text{ nm}} - \text{OD}_{630 \text{ nm}}) \times 100\%$$

注：建议实验室建立自己的参考范围。

3. 阴性对照质控范围：正常情况下，Negative Control 工作液 OD_{450 nm}-OD_{630 nm}>1.0。

4. 阳性对照质控范围：正常情况下，Positive Control 工作液（1:10 稀释）OD_{450 nm}-OD_{630 nm}<0.2。

【检验结果的解释】

a. 抗体定性检测

阳性样本检测：样本抑制率 \geq 临界值（Cut-off），检测到样本中含有新型冠状病毒(B.1.1.529)中和抗体(Spike RBD)。

阴性样本检测：样本抑制率<临界值（Cut-off），未检测到样本中含有新型冠状病毒(B.1.1.529)中和抗体(Spike RBD)。

b. 抗体滴度检测

抗体滴度的判定：将阳性样本进行梯度稀释，检测样本结果仍判定为阳性时的最大稀释度。

【检测方法的局限性】

本产品仅用于检测人血清样本中新型冠状病毒(B.1.1.529)中和抗体(Spike RBD)，未对半定量检测方法建立定量限（Limit of Quantitation, LoQ）、检测区间上限（Upper Limit of Measuring Interval, ULMI）和临界值（Cut-off），如果使用者计划进行半定量检测，建议根据需要自行建立半定量检测方法。

【产品性能】

1. 精密度：批内差 CV%<15%
批间差 CV%<15%
2. 特异性：100%（77 份阴性血清，0 份血清检测为阳性）

【注意事项】

1. 本产品仅供科研使用，不能用于治疗 and 诊断。
2. 请严格按使用说明进行操作。
3. 不同批号的试剂不能混用。不可与其他厂家试剂混用。
4. 使用前各组份需平衡至室温，保证溶液晶体全部溶解。请在无尘洁净的环境下进行操作使用。
5. 试剂盒请在 2-8°C 保存，请勿使用过有效期的试剂盒。
6. 请根据实验需要配制各组份工作液，除 10x Washing Buffer 以外，工作液即配即用，不可保存。

【示例数据】

注:示例数据仅供参考, 请以实际检测数据为准。

a. 抗体定性检测

检测结果	结果判定	检测结果解释
样本抑制率=15%	阴性	未检测到新型冠状病毒(B.1.1.529)中和抗体(Spike RBD)
样本抑制率=32%	阳性	检测到新型冠状病毒(B.1.1.529)中和抗体(Spike RBD)

b. 抗体滴度检测

注: 不同板间的质控数据不能混用。每次测定均需设置阴性和阳性对照。

稀释倍数	样本 OD _{450 nm} -OD _{630 nm}	抑制率	Result
10	0.147	95%	抗体滴度为 320
20	0.228	92%	
40	0.477	83%	
80	0.872	70%	
160	1.732	40%	
320	2.100	27%	
640	2.594	10%	
blank	2.883	0%	