

新型冠状病毒IgG抗体(小鼠)滴度检测试剂盒 (酶联免疫分析法)

【产品名称】

新型冠状病毒IgG抗体(小鼠)滴度检测试剂盒

【产品货号】

RAS-T018

【规格】

96 tests

【预期用途】

本试剂盒适用于小鼠血清中新型冠状病毒IgG抗体(新冠RBD蛋白)定性和滴度检测。

【检测原理】

本试剂盒采用间接ELISA方法，酶标板上预包被了SARS-CoV-2 Spike RBD，加入稀释后的待检测样本，孵育结束后加入辣根过氧化物酶（HRP）标记抗体，形成抗原-抗体-酶标记抗体复合物。洗板后加入底物显色液，HRP催化底物生成蓝色物质，加入终止液溶液变成黄色，在450 nm和630 nm测定其吸光度值（OD_{450 nm}、OD_{630 nm}），OD_{450 nm}-OD_{630 nm}与样品中的SARS-CoV-2 抗体含量呈正相关。

【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
RAS018-C01	Pre-coated with SARS-CoV-2 Spike RBD Microplate	1 plate	固体	2-8°C	2-8°C
RAS018-C02	Anti-SARS-CoV-2 Antibody (Control, Mouse IgG)	100 μL	液体	2-8°C	-70°C

RAS018-C03	HRP-Conjugated Antibody	10 µg	冻干粉	2-8°C, 避光	-70°C, 避光
RAS018-C04	10×Washing Buffer	50 mL	液体	2-8°C	2-8°C
RAS018-C05	Dilution Buffer	50 mL	液体	2-8°C	2-8°C
RAS018-C06	Substrate Solution	12 mL	液体	2-8°C, 避光	2-8°C, 避光
RAS018-C07	Stop Solution	7 mL	液体	2-8°C	2-8°C
RAS018-C08	SARS-CoV-2 Antibody Positive Control	100 µL	液体	2-8°C	2-8°C
RAS018-C09	SARS-CoV-2 Antibody Negative Control	100 µL	液体	2-8°C	2-8°C

【储存条件及有效期】

未开封：试剂盒保存于2-8°C，有效期见外包装箱标签。

已开封：试剂盒开封后各组分按照表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

【试剂准备】

1. 使用前将所有试剂恢复至室温 (20°C-25°C)。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°C平衡10-15 min）。
2. 按照表2建议，将提供的HRP-Conjugated Antibody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°C保存，建议冻融次数不要超过3次。

注：1. 为避免表面吸附性损失和失活，每个小瓶中分装的重组蛋白不得少于 5 µg。

2. HRP-Conjugated Antibody 复溶液应避光保存。

表2. 配制方法

ID	组份名称	规格 (96 T)	存储液浓度.	重构水体积 Vol.
RAS018-C03	HRP-Conjugated Antibody	10 µg	50 µg/mL	200 µL

【检测流程】

1. 工作液准备

1.1 配制1×Washing Buffer:

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

1.2 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1:100。

b. 若用于抗体滴度或半定量检测:

b.1 建议将待检样本用Dilution Buffer从1:100-1:12800进行稀释。

b.2 若进行滴度检测，建议将Negative Control用Dilution Buffer从1:100-1:12800进行稀释，将Positive control用Dilution Buffer从1:100-1:51200进行稀释。

若进行半定量实验，建议将参考品Anti-SARS-CoV-2 Antibody (Control, Mouse IgG)用Dilution Buffer进行稀释，稀释范围0.2-6.25 ng / mL，浓度见参考品的管签。

2. 加样

在对应板孔内加入 100 µL 稀释后的待检样品，Positive Control 工作液、Negative Control 或参考品工作液。对于空白对照，在孔中加入 100 µL Dilution Buffer。若一次实验样本数较多，可采用多道微量移液器取样稀释。

3. 孵育

用封板膜封板，放置 37°C 恒温培养箱孵育 1.0 h。

4. 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，最后一次拍干孔中液体。

5. 加 HRP 酶标物

用 Dilution Buffer 将 HRP-Conjugated Antibody 复溶液从 50 μ g/mL 稀释至 0.08 μ g/mL，该工作液现配现用。在对应板孔内加入 100 μ L 稀释后的 HRP-Conjugated Antibody 工作液，用封板膜封板，放置 37°C 恒温培养箱孵育 1.0 h，重复步骤 4 洗板。

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°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 处波长的吸光值，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。

【阳性判断值】

临界值（Cut-off）计算：临界值=0.1。

注：建议各实验室建立自己的参考范围。

1. 阴性对照质控标准：Negative Control(1:100) OD_{450 nm}-OD_{630 nm}<0.1。

2. 阳性对照质控标准：Positive Control(1:800) OD_{450 nm}-OD_{630 nm}≥1.0。

注：阴阳性对照品的实验结果应符合质控标准，否则本次实验无效，建议重复实验。

【检测结果解释】

阳性判定：样品 OD_{450 nm}-OD_{630 nm}≥Cut-off 判定为新冠 IgG 抗体(新冠 RBD 蛋白)阳性。

阴性判定：样品 $OD_{450\text{ nm}}-OD_{630\text{ nm}} < \text{Cut-off}$ 判定为新冠 IgG 抗体(新冠 RBD 蛋白)阴性。

a. 抗体滴度的判定：

将阳性样本进行梯度稀释，检测样本结果判定为阳性时的最大稀释度。

b. 抗体的半定量检测：

以标准品的浓度为横坐标， $OD_{450\text{ nm}}-OD_{630\text{ nm}}$ 为纵坐标，绘制标准曲线。为了校准标准曲线所获得的吸光度值，可将待测样品的 OD 值减去空白对照的 OD 值。利用四参数或者其他统计学软件进行绘制标准曲线并进行样品浓度的计算。

【检测方法的局限性】

本产品仅供小鼠血清中新型冠状病毒 IgG 抗体(新冠 RBD 蛋白)滴度或半定量检测，不能用于定量检测。

【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. 不同厂家及同一厂家不同批号试剂盒的组份不能混用；
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，工作液即配即用，不可保存。