

甲型流感病毒(H3N2)血凝素特异性定量检测试剂盒

【产品名称】

甲型流感病毒(H3N2)血凝素特异性定量检测试剂盒

【规格】

96 Tests

【货号】

RAS-A187

【预期用途】

本试剂盒可特异性识别甲型流感病毒[A/Darwin/6/2021 (H3N2)]血凝素，甲型流感病毒[A/Darwin/9/2021 (H3N2)]血凝素以及甲型流感病毒[A/Thailand/8/2022 & A/Massachusetts/18/2022 (H3N2)]血凝素。

【检测原理】

本试剂盒应用ELISA夹心法。微孔板预包被了Anti-HA (Influenza A (H3N2)) Antibody，样本中的HA (Influenza A (H3N2))与微孔板上固定的Anti-HA (Influenza A (H3N2)) Antibody结合，然后加入HRP-HA (Influenza A (H3N2)) Antibody，形成抗体-抗原-标记抗体复合物，最后加入底物显色，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处测定样品吸光度值（OD_{450 nm}、OD_{630 nm}），OD_{450 nm}- OD_{630 nm}与样本中的甲型流感病毒(H3N2)血凝素含量呈正相关。

【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
RAS187-C01	Pre-coated Anti-HA (Influenza A (H3N2)) Antibody Microplate	1 plate	固体	2-8°C	2-8°C
RAS187-C02	HA (Influenza A/Darwin/6/2021 (H3N2)) Standard	20 µg	冻干粉	2-8°C	-70°C
RAS187-C03	HRP-Anti-HA (Influenza A (H3N2)) Antibody	20 µg	冻干粉	2-8°C, 避光	-70°C, 避光
RAS187-C04	10×Washing Buffer	50 mL	液体	2-8°C	2-8°C
RAS187-C05	2×Dilution Buffer	50 mL	液体	2-8°C	2-8°C
RAS187-C06	Substrate Solution	12 mL	液体	2-8°C, 避光	2-8°C, 避光
RAS187-C07	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，有效期见外包装标签。
- 2.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：1. 不要使用过期试剂。

2. 冻干粉重构后需-70°C储存，建议分装规格不低于5 µg，冻融次数不要超过1次。

【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】

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）。

按照表2建议，用超纯水将所提供的冻干品配制成存储溶液，在室温下溶解15至30分钟，轻轻吹吸混匀，避免剧烈摇动或涡旋。重构的存储液应在-70°C保存，建议分装规格不低于5µg，冻融次数不要超过1次。

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.
RAS187-C02	HA (Influenza A/Darwin/6/2021 (H3N2)) Standard	20 µg	100 µg/mL	200 µL water
RAS187-C03	HRP-Anti-HA (Influenza A (H3N2)) Antibody	20 µg	100 µg/mL	200 µL water

【检测流程】

1. 工作液配制

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1×Dilution Buffer:

取50 mL 2×Dilution Buffer，用1×Washing Buffer稀释并定容至100 mL。

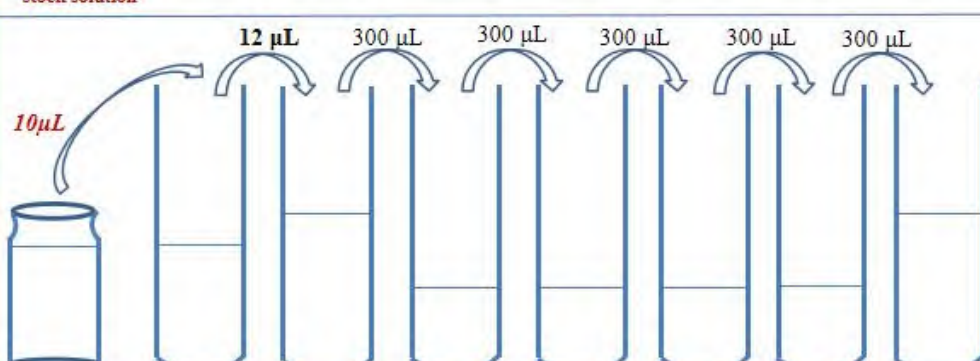
1.3 配制HRP-Anti-HA (Influenza A (H3N2)) Antibody工作液:

用1×Dilution Buffer将HRP-Anti-HA (Influenza A (H3N2)) Antibody存储液稀释至2.0 µg/mL，需避光保存，现用现配。

2. 制备标准曲线

复溶后标准品(RAS187-C02)的浓度为 **100 µg/mL**，取 10 µL 的标准品储存液，加入 490 µL

的稀释液，作为 Std.-0(2000 ng/mL)，然后取 Std.-0 溶液 12 μL ，加入到 588 μL 的稀释液中，作为 **Std.-1(40 ng/mL)**。在后续每一个离心管中加入 300 μL 稀释液，使用高浓度标准品做 1:1 系列稀释。每次移液时，确保充分混匀。以稀释液作为标准曲线的零浓度。

Tubes/ Solution Code	HA (Influenza A/Darwin/6/2021 (H3N2)) Standard stock solution	Std.-0	Std.-1	Std.-2	Std.-3	Std.-4	Std.-5	Std.-6
Operating								
		100 $\mu\text{g/mL}$	2000 ng/mL	40 ng/mL	20 ng/mL	10 ng/mL	5 ng/mL	2.5 ng/mL
Solution Con.								
Dilution Buffer Vol.		490 μL	588 μL	300 μL	300 μL	300 μL	300 μL	300 μL

3. 加样

在对应板孔内先加入 50 μL 系列稀释后的标准品和待测样品，空白对照孔加入 50 μL 1 \times Dilution Buffer，然后每孔再加入 50 μL 的 **HRP-Anti-HA (Influenza A (H3N2)) Antibody (稀释至 2.0 $\mu\text{g/mL}$)** 工作液，轻轻震荡酶标板混匀。此步骤需连续操作，切勿间隔时间较长，以免影响结果。

注：1. 待测样品和标准曲线建议设置复孔

2. 反应孔内标准品终浓度为 20-0.625 ng/mL。

4. 孵育

用封板膜封板，室温孵育 1.0 h。

5. 洗板

小心揭开封板膜。弃去孔中液体，每孔加入 300 μL 1 \times Washing Buffer，浸泡 30 s，共洗板 3 次。每次洗板后，需在吸水纸上拍干。

6. 显色

将微孔板拍干，每孔加入 100 μ L Substrate Solution。用封板膜封板，室温避光孵育 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，请在终止后 5 分钟内读数。

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

【结果分析】

1. 标准曲线 R^2 应大于 0.9900，检测范围为 0.625-20 ng/mL。
2. 如果待测样品 OD 值超过标准曲线最高点，需将待测样品用样品稀释液进行稀释并重新测定。
3. 将标准曲线和待测样品的 OD 值，扣减空白孔的 OD 值后得到校准的吸光度值。以标准品的浓度为横坐标，用校准的吸光度值为纵坐标，绘制标准曲线。利用四参数拟合进行绘制标准曲线并进行样品浓度的计算。若使用直线拟合，需选取合适的作图区间绘制标准曲线，以保证浓度计算的准确性。

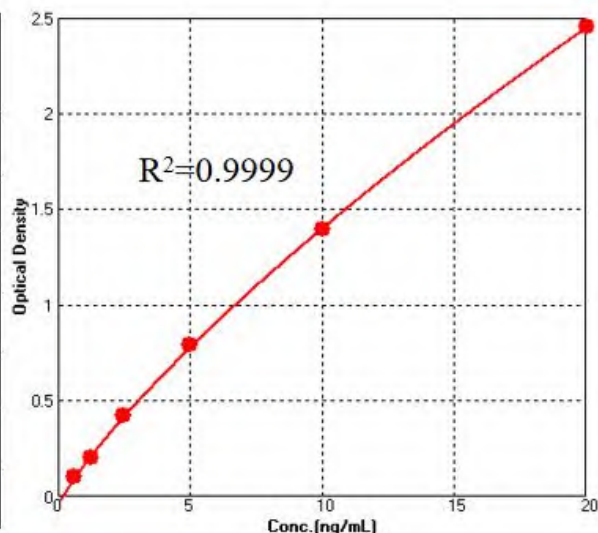
【注意事项】

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. 不可与其他厂家试剂混用。本试剂盒不同批号的试剂不能混用。
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 $^{\circ}$ C 保存，请勿使用过有效期的试剂盒。

【典型数据】

以下数据仅供参考，以实验测定的标准曲线结果进行样本浓度计算。

Standard (ng/mL)	O.D.-1	O.D.-2	Average	Corrected
20	2.457	2.498	2.478	2.452
10	1.384	1.464	1.424	1.398
5	0.821	0.809	0.815	0.789
2.5	0.431	0.460	0.446	0.420
1.25	0.230	0.223	0.227	0.201
0.625	0.132	0.130	0.131	0.105
0	0.025	0.027	0.026	/



【精密度】

a. 批内精密度

3 个已知浓度的样本批内重复测试 10 次，以评估批内的精密度。

b. 批间精密度

3 个已知浓度的样本批间重复测试 3 次，以评估批间的精密度。

样本	批内精密度			批间精密度		
	1	2	3	1	2	3
n	10	10	10	3	3	3
平均值(ng/mL)	15.463	3.853	0.964	15.430	3.820	0.911
标准差	1.319	0.275	0.076	0.597	0.259	0.046
变异系数(%)	8.5	7.1	7.9	3.9	6.8	5.1

【准确度】

通过对 3 个不同浓度的标准品进行测试，计算回收率。

样品(n=5)	平均回收率%	范围%

高	96.7	87.0-109.2
中	86.2	81.2-94.4
低	85.3	81.6-95.3

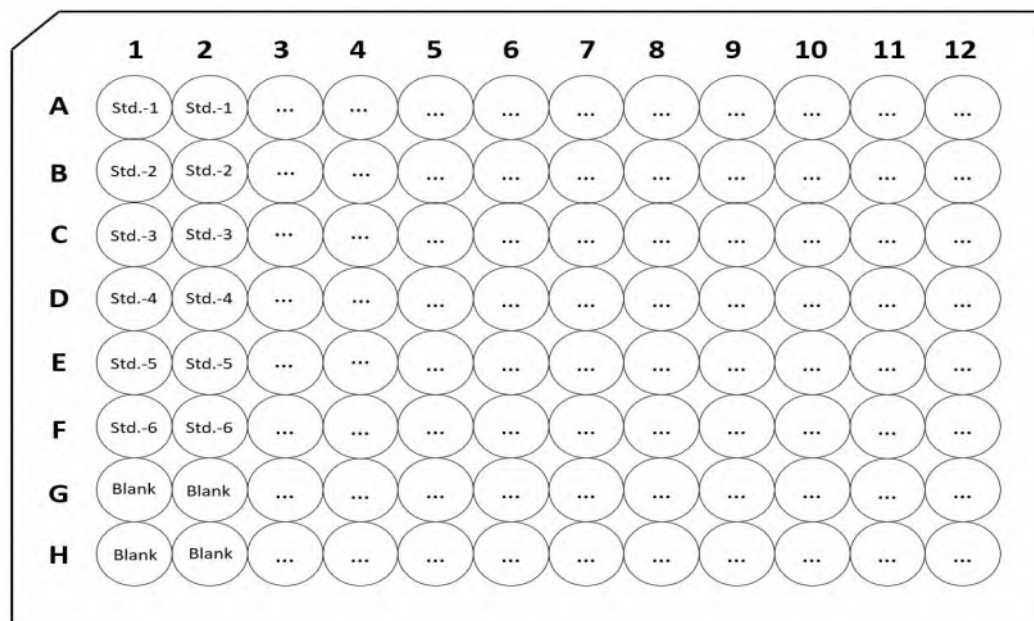
【稀释线性】

将高浓度的标准品加入到不同的稀释基质中，进行梯度稀释，评估检测的线性。

		细胞培养基(DMEM)	细胞培养基(1640)
1:2	平均回收率%	100.2	102.2
	范围(%)	96.5-105.9	95.1-109.2
1:4	平均回收率%	100.5	101.0
	范围(%)	95.6-107.0	95.5-105.7
1:8	平均回收率%	100.2	97.7
	范围(%)	95.5-103.6	93.8-101.4
1:16	平均回收率%	94.5	90.8
	范围(%)	88.2-104.4	85.8-96.6

【PLATE LAYOUT】

建议使用此平板布局记录标准品和样品



注：Blank为空白对照Dilution Buffer孔。

【实验过程中可能遇到的问题及解决方案】

问题	可能的原因	解决办法
1. 结果 OD 值非常低	(1) 孵育的时间或温度不够； (2) 显色反应时间太短； (3) 所用配制缓冲液的蒸馏水有问题； (4) 不正确的试剂储存方式或/和加入抗体/酶的工作液浓度太低； (5) 酶标仪滤光片不正确； (6) 不正确的试剂储存方式； (7) 试剂盒没有充分平衡； (8) 移液器吸液量不足，吸嘴内壁挂水太多或内壁不清洁； (9) 包袋中有湿气； (10) 试剂在使用前未混匀； (11) 洗涤步骤过于剧烈； (12) 实验开始后，微孔变干燥；	a. 校正孵育箱温度； b. 校正定时钟准确定时； c. 使用新鲜合格的蒸馏水； d. 按照说明书保存试剂盒和准确配制工作液； e. 校正酶标仪； f. 保证各试剂在推荐储存温度下储存； g. 试剂室温平衡至少 15 分钟，确保所有试剂已平衡至室温（20-25°C）； h. 校正移液器，吸嘴要配套，装吸嘴时要紧密，吸嘴内壁要清洁，最好一次性使用； i. 首次开袋标上日期，封好未使用的孔条，放入干燥剂； j. 使用前混匀试剂； k. 降低洗涤系统的压力； l. 实验过程勿中断，应连续完成所有的实验步骤；
2. 标准曲线和测定的重复性差	这是典型的由测定操作引起的问题，包括但不限于： (1) 加样本及试剂量不准；孔间不一致；加错样本；温育时间、洗板、显色时间不一致；	a. 重复测定样本，操作条件、人员等应尽可能与上次保持一致，以排除这些因素造成的不一致的可能性； b. 尽可能使用同一移液器并装紧吸嘴； c. 加液时小心操作；

	<p>(2) 加样本及试剂时，加在孔壁上部非包被区；</p> <p>(3) 加样过快，孔间发生污染；</p> <p>(4) 试剂/样本没有混匀；</p> <p>(5) 样本中有杂质或沉淀物；血清样本未完全凝固即加入，反应孔内出现纤维蛋白凝固或残留血细胞，易出现假阳性反应等；</p> <p>(6) 微孔中有气泡；</p> <p>(7) 倍比稀释标准品时未混匀；</p> <p>(8) 过早稀释</p> <p>(9) 使用用过的封板胶纸</p> <p>(10) 加入的体积不正确</p> <p>(11) 不同批号试剂盒中组分混用；</p>	<p>d. 样本稀释前应充分混匀，确保充分混匀试剂；</p> <p>e. 使用前离心；</p> <p>f. 用针尖挑破气泡；</p> <p>g. 稀释标准品的每一步均需混匀；</p> <p>h. 标准品在快要使用时稀释；</p> <p>i. 每次须使用新的封板胶封住反应；</p> <p>j. 快速、等量的将标准品分配到各个微孔中；</p> <p>k. 不混用不同批号试剂盒中组分；</p>
<p>3.空白背景高</p>	<p>(1) 洗板不干净；</p> <p>(2) 试剂过期；</p> <p>(3) 洗涤不充分；</p> <p>(4) 阴性对照孔被阳性对照或样品污染；</p> <p>(5) 蒸馏水受酶等污染；</p> <p>(6) 试剂混用；</p> <p>(7) 试剂配制浓度有误，如酶的浓度过高；</p> <p>(8) 孵育温度过高或反应时间过长；</p> <p>(9) 显色时间过长；</p>	<p>a. 浓缩洗液准确配制：10xWashing Buffer 如有结晶则应让结晶于室温全部溶解后再量取稀释；</p> <p>b. 使用保质期内试剂；</p> <p>c. 充分洗涤，彻底拍干；</p> <p>d. 加样或加酶拍板的滤纸应弃去不用，不要反复使用，否则易造成污染；吸嘴尽可能一次性使用；</p> <p>e. 使用新鲜蒸馏水；</p> <p>f. 不同批号试剂勿混用；</p> <p>g. 请按说明书所示稀释倍数配制；</p>

	(10) 底物在使用前曝光; (11) 读板前停留时间过长;	h. 检查孵育箱的温度是否正确、稳定; i. 显色反应时间适当缩短; j. 应保存在暗处, 避光; k. 加终止液后 10 分钟内读数;
4.边缘效应	(1) 蒸发; (2) 温度不均匀;	a. 各步之间, 须使用封版胶密封反应板; b. 校准孵育箱, 勿叠放反应板;
5.标准曲线良好, 但样本无检测信号	(1) 样本中无检测物或检测物含量极低; (2) 样本中其他物质影响/掩盖检测; (3) 样本中检测物浓度过高, Hook 效应导致假低值。	a. 设置内参, 重新实验; b. 作适当稀释, 降低其他物质的干扰, 或作系列稀释, 检测回收率; c. 适当倍数稀释样本, 检测物浓度尽量在试剂盒检测范围内。