

狂犬病病毒核蛋白(Nucleoprotein)检测试剂盒

【产品名称】

狂犬病病毒核蛋白(Nucleoprotein)检测试剂盒

【规格】

96 Tests

【货号】

RAS-A195

【预期用途】

本试剂盒用于狂犬病病毒核蛋白特异性定量检测。

【检测原理】

本试剂盒应用ELISA夹心法。微孔板预包被了Anti-Nucleoprotein (RABV) Antibody，样本中的Nucleoprotein (RABV)与微孔板上固定的Anti-Nucleoprotein (RABV) Antibody结合，然后加入Biotin-Anti-Nucleoprotein (RABV) Antibody，形成抗体-抗原-生物素标记抗体复合物，最后加入Streptavidin-HRP，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处测定样品吸光度值（OD450nm 、OD630nm），OD450nm- OD630nm与样本中的狂犬病病毒核蛋白含量呈正相关。

【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
RAS195-C01	Pre-coated Anti-Nucleoprotein (RABV) Antibody	1 plate	固体	2-8°C	2-8°C

1 / 10

	Microplate				
RAS195-C02	Nucleoprotein (RABV) Standard	15 µg	冻干粉	2-8°C	-70°C
RAS195-C03	Biotin-Anti- Nucleoprotein (RABV) Antibody	15 µg	冻干粉	2-8°C	-70°C
RAS195-C04	Streptavidin-HRP	15 µg	冻干粉	2-8°C, 避光	-70°C, 避光
RAS195-C05	10×Washing Buffer	50 mL	液体	2-8°C	2-8°C
RAS195-C06	2×Dilution Buffer	50 mL	液体	2-8°C	2-8°C
RAS195-C07	Substrate Solution	12 mL	液体	2-8°C, 避光	2-8°C, 避光
RAS195-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，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存储条件保存，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5 µg，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.
RAS195-C02	Nucleoprotein (RABV) Standard	15 µg	100 µg/mL	150 µL
RAS195-C03	Biotin-Anti- Nucleoprotein (RABV) Antibody	15 µg	100 µg/mL	150 µL
RAS195-C04	Streptavidin-HRP	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Biotin-Anti-Nucleoprotein (RABV) Antibody工作液:

用1×Dilution Buffer将Biotin-Anti-Nucleoprotein (RABV) Antibody存储液稀释至0.2 µg/mL，现用现配。

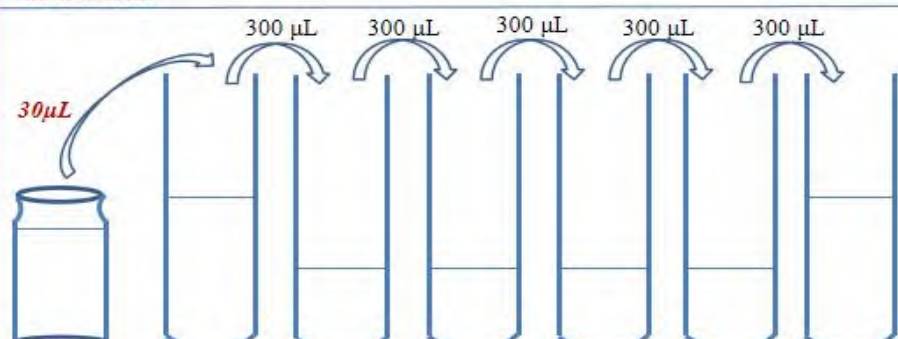
1.4 配制Streptavidin-HRP工作液:

用1×Dilution Buffer将Streptavidin-HRP稀释至0.1 µg/mL，该工作液避光保存，需现用现配。

2. 制备标准曲线

标准品(RAS195-C02)的浓度为 **100 µg/mL**，取 30 µL 的标准品储存液，加入 570 µL 的稀释液，作为标准曲线的最高浓度 **Std.-1(5000 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	Nucleoprotein (RABV) Standard stock solution	Std.-1	Std.-2	Std.-3	Std.-4	Std.-5	Std.-6
Operating							
Solution Con.	100 µg/mL	5000 ng/mL	2500 ng/mL	1250 ng/mL	625 ng/mL	312.5 ng/mL	156.25 ng/mL
Dilution Buffer Vol.		570 µL	585 µL	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL

3. 加样

将待测样品和系列稀释后的标准品加入反应孔内，每孔加入 100 µL，空白对照孔加入 100 µL 1×Dilution Buffer。

注：待测样品和标准曲线建议设置复孔。

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×Washing Buffer，浸泡 30 s，弃去孔中液体，拍干，共洗板 3 次。每次洗板后，需在吸水纸上拍干。

6. 加 Biotin-Anti-Nucleoprotein (RABV) Antibody

在对应板孔内加入 100 µL 的 **Biotin-Anti-Nucleoprotein (RABV) Antibody**(稀释至 0.2 µg/mL) 工作液，该工作液现用现配，依次重复操作**步骤 4 及步骤 5**。

7. 加 Streptavidin-HRP

在对应板孔内加入 100 μL 的 **Streptavidin-HRP (稀释至 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)**，该工作液现用现配，依次重复操作**步骤 4 及步骤 5**。

8. 显色

将微孔板拍干，每孔加入 100 μL Substrate Solution。用封板膜封板，室温避光孵育 20 min。

9. 终止

每孔加入 50 μL 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。

10. 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 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 扣除 $\text{OD}_{630\text{nm}}$ 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 156.25-5000 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。

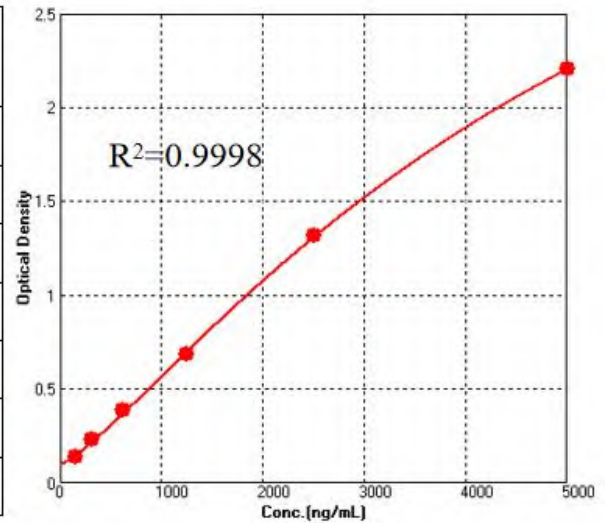
【注意事项】

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 $^{\circ}\text{C}$ 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
5000	2.213	2.241	2.227	2.206
2500	1.287	1.392	1.340	1.319
1250	0.721	0.697	0.709	0.688
625	0.419	0.397	0.408	0.387
312.5	0.250	0.250	0.250	0.229
156.25	0.167	0.158	0.163	0.142
0	0.021	0.021	0.021	/



【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)	3896.658	933.040	400.426	4090.889	918.876	411.623
标准差	104.589	49.678	20.014	168.258	45.840	20.479
变异系数(%)	2.7	5.3	5.0	4.1	5.0	5.0

【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	91.8	81.8-113.6
中	91.5	85.5-100.5
低	112.6	103.8-117.4

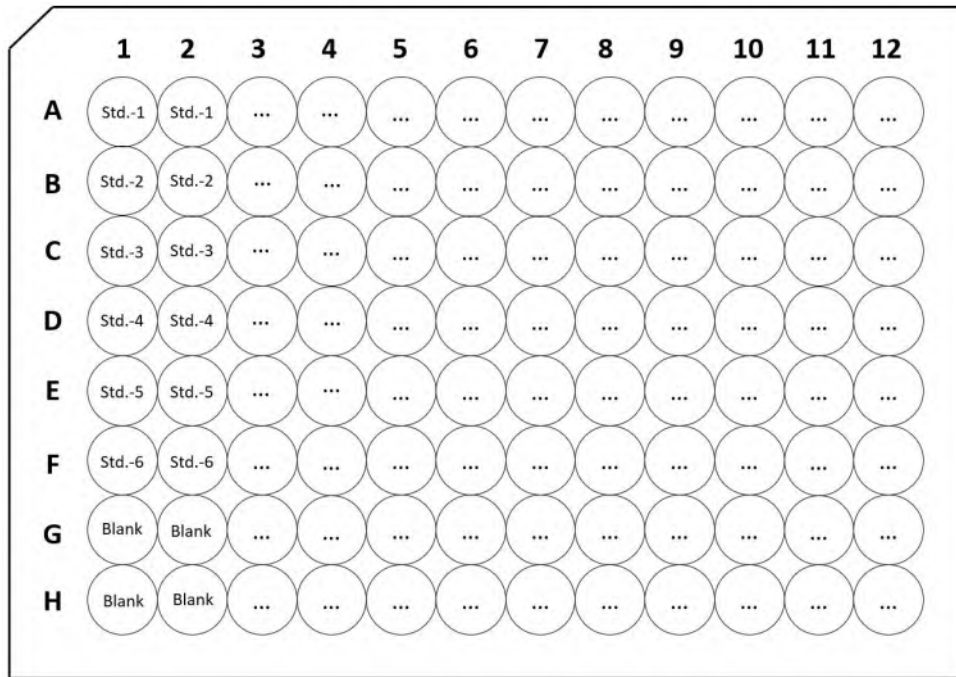
【稀释线性】

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%	97.1	100.3
	范围(%)	94.3-99.9	98.1-102.2
1:4	平均回收率%	92.5	95.6
	范围(%)	91.3-94.6	92.7-97.6
1:8	平均回收率%	101.1	102.5
	范围(%)	100.5-101.5	100.1-103.9
1:16	平均回收率%	116.1	113.7
	范围(%)	113.0-118.9	111.8-116.2

【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；	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）；

	<p>(8) 移液器吸液量不足，吸嘴内壁挂水太多或内壁不清洁；</p> <p>(9) 包袋中有湿气；</p> <p>(10) 试剂在使用前未混匀；</p> <p>(11) 洗涤步骤过于剧烈；</p> <p>(12) 实验开始后，微孔变干燥；</p>	<p>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；</p> <p>i. 首次开袋标上日期，封好未使用的孔条，放入干燥剂；</p> <p>j. 使用前混匀试剂；</p> <p>k. 降低洗涤系统的压力；</p> <p>l. 实验过程勿中断，应连续完成所有的实验步骤；</p>
<p>2. 标准曲线和测定的重复性差</p>	<p>这是典型的由测定操作引起的问题，包括但不限于：</p> <p>(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；</p> <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>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；</p> <p>b. 尽可能使用同一移液器并装紧吸嘴；</p> <p>c. 加液时小心操作；</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>(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>	
3.空白背景高	<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>(10) 底物在使用前曝光;</p> <p>(11) 读板前停留时间过长;</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> <p>h. 检查孵育箱的温度是否正确、稳定;</p> <p>i. 显色反应时间适当缩短;</p> <p>j. 应保存在暗处, 避光;</p> <p>k. 加终止液后 10 分钟内读数;</p>
4.边缘效应	<p>(1) 蒸发;</p> <p>(2) 温度不均匀;</p>	<p>a. 各步之间, 须使用封版胶密封反应板;</p> <p>b. 校准孵育箱, 勿叠放反应板;</p>
5.标准曲线良好, 但样本无检测信号	<p>(1) 样本中无检测物或检测物含量极低;</p> <p>(2) 样本中其他物质影响/掩盖检测;</p> <p>(3) 样本中检测物浓度过高, Hook 效应导致假低值。</p>	<p>a. 设置内参, 重新实验;</p> <p>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;</p> <p>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。</p>