新型冠状病毒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】

新型冠状病毒中和抗体滴度检测试剂盒(新冠RBD蛋白)

【产品货号】

RAS-N022

【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中和抗体，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中和抗体与微孔板上固定的Human ACE2 Protein特异性竞争HRP-SARS-CoV-2 Spike RBD。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（$OD_{450\,nm}$、$OD_{630\,nm}$）。样本$OD_{450\,nm}$-$OD_{630\,nm}$与样本中新型冠状病毒中和抗体的含量呈负相关。

【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
RAS022-C01	Pre-coated Human ACE2 Microplate	1 plate	固体	2-8°C	2-8°C
RAS022-C02	Positive Control	100 µL	液体	2-8°C	2-8°C
RAS022-C03	Negative Control	100 µL	液体	2-8°C	2-8°C
RAS022-C04	HRP-SARS-CoV-2 Spike RBD	10 µg	冻干粉	2-8°C，避光	-70°C，避光
RAS022-C05	10xWashing Buffer	50 mL	液体	2-8°C	2-8°C
RAS022-C06	Dilution Buffer	50 mL	液体	2-8°C	2-8°C
RAS022-C07	Substrate Solution	12 mL	液体	2-8°C，避光	2-8°C，避光
RAS022-C08	Stop Solution	7 mL	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℃，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。

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

【样本要求】

1. 样本类型：人血清。

2. 样本处理：采血管采集人全血样本后室温静置30 min，3000 g离心5 min，取上清液。处理后的血清可用于样本检测。

3. 样本保存：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。

4. 检测前样本应至少在室温条件下平衡30 min以上，并混合均匀。

注：a. 样本溶血会影响检测结果，溶血样本不适合本试剂盒的检测。

b. 未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℃)。如果溶液中有结晶形成，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.
RAS022-C04	HRP-SARS-CoV-2 Spike RBD	10 μg	100 μg/mL	100 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HRP-SARS-CoV-2 Spike RBD工作液：用Dilution Buffer将HRP-SARS-CoV-2 Spike RBD冻干品复溶液稀释至1 μg/mL。

1.3 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。

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1:10-1:320进行2倍稀释。如果样本超出建议的稀释区间，建议增加稀释倍数，重新进行检测。

2. 加样

在对应板孔内加入 50 μL 稀释后的待检样本、Positive Control 和 Negative Control。每孔再加入 50 μL HRP-SARS-CoV-2 Spike RBD 工作液，轻轻震荡混匀。

3. 孵育

用封板膜封板，放置 37℃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 μL 1×Washing Buffer，浸泡 30 s。共洗板 3 次。

5. 显色

将微孔板拍干，每孔加入 100 μL Substrate Solution。用封板膜封板，放置 37℃恒温培养箱避光孵育 20 min。

6. 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。

7. 读数

用酶标仪测定各孔在 450 nm、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。

【参考值】

1. 临界值（Cut-off）=样品抑制率=20%,采用统计学方法进行确定；

样本抑制率=(1-样品 OD 值/Negative Control OD 值)×100%。

注：建议实验室建立自己的参考范围。

2. 阴性对照质控范围：正常情况下，Negative Control OD 值＞0.8；
3. 阳性对照质控范围：正常情况下，1:10 稀释的 Positive Control OD 值＜0.1；

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。

【检验结果的解释】

a. 抗体定性检测

1. 阳性检测结果：样本抑制率≥临界值（Cut-off），检测到样本中含有新型冠状病毒中和抗体。
2. 阴性检测结果：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中和抗体。

b. 抗体滴度检测

抗体滴度的分析：将阳性样本进行梯度稀释，样本结果仍检测为阳性时的最大稀释度，即为该样本的检测抗体滴度。

【检测方法的局限性】

本产品仅用于人血清样本中新型冠状病毒中和抗体的定性及滴度检测，未对半定量或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或半定量检测，建议根据需要自行建立检测方法。

【产品性能】

1. 精密度：批内差 CV%＜15%

   批间差 CV%＜15%

2. 特异性：98.6%（70 份正常人血清，1 份血清检测为阳性）

【注意事项】

1. 本产品仅供科研使用，不能用于治疗和诊断。
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。请在洁净的环境下进行操作使用。
5. 试剂盒请在 2-8℃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分工作液，除 10xWashing Buffer 以外，工作液即配即用，不可保存。

【示例数据】

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=14%	阴性	未检测到新型冠状病毒中和抗体
样本抑制率=30%	阳性	检测到新型冠状病毒中和抗体

b. **抗体滴度检测**

稀释倍数	样本 OD 值	抑制率	Result
10	0.083	52%	抗体滴度为 40
20	0.147	26%	
40	**0.396**	**22%**	

80	1.045	13%	
160	1.599	2%	
320	1.731	1%	
blank	1.749	0%	