

人呼吸道合胞病毒 (RSV) F 蛋白 ELISA 检测试剂盒

产品简介：

呼吸道合胞病毒 (Respiratory syncytial virus, RSV) 属于副黏病毒科的肺病毒属 (Pneumovirus) , 主要引起 6 个月以下婴儿患细支气管炎和肺炎等下呼吸道感染, 以及较大儿童和成人的鼻炎、感冒等上呼吸道感染。其发生机制除病毒感染直接作用外, 可能与婴幼儿呼吸道组织学特性、免疫功能发育未完善及免疫病理损伤有关。严重 RSV 疾病免疫病理损伤主要是机体产生特异性 IgE 抗体与 RSV 相互作用引起 I 型超敏反应。

本试剂盒采用双抗体夹心酶联免疫定量法检测 human RSV-F 蛋白含量, 酶标板采用纳米共价包被 Human RSV F 蛋白捕捉抗体, 检测时酶标板孔加入待检样品或标准品, 再加入 F 蛋白检测抗体 (生物素化抗 RSV F 蛋白抗体) , 反应后加入链霉亲和素 HRP, 最后加入单组份 TMB 底物液显色; 如果待检样品中含有 RSV-F 蛋白, TMB 底物液在 HRP 催化下显色, 加入终止液终止显色后, 在酶标仪 OD₄₅₀/OD₆₃₀ 读取吸光值, 在合适浓度范围内, 吸光值大小与待检测样品中 RSV-F 蛋白浓度呈正相关, 根据标准品浓度/吸光值绘制的标准曲线, 可计算出待检样品中 F 蛋白含量。

适用范围：

本产品适用于体外定量检测人血清、血浆, 细胞培养液或其它相关生物液体中人呼吸道合胞病毒 (RSV) F 蛋白含量。

主要组分：

组分名称	规格	保存条件	数量
ELISA 酶标板(Coated with RSV F-Protein Capture Antibody)	96T	-20°C	1
标准品(Recombinant Human RSV F Protein) 500ng/mL	0.5ml	-20°C	2
检测抗体 (Biotinylated Antibody anti-RSV F protein,100×)	120ul	-20°C	1
链霉亲和素 HRP (HRP- Streptavidin,100×)	120ul	-20°C	1
通用稀释液(General Dilution Buffer)	30ml	4°C	1
浓缩洗涤液 (concentrated wash Buffer, 25×)	30ml	4°C	1
TMB 底物液(TMB substrate solution)	12ml	4°C	1
反应终止液(Stop Solution)	12ml	4°C	1
酶标板覆膜(Plate Sealers)			5
产品说明书(Product manual)			1

特别说明：

1. 打开包装后请及时检查所有组分是否齐全完整；
2. 一周内使用可暂存于 4°C, 如需远期或多次频繁使用, 每次用完请按各组分建议的保存条件妥善存放。

实验所需自备物品:

1. 酶标仪(带有 450nm 和 630nm 波长滤光片)
2. 高精度移液器, EP 管及一次性吸头: 0.5-10μL, 2-20μL, 20-200μL, 200-1000μL

3.37°C恒温箱，双蒸水或去离子水

4.吸水纸

待检测样品的收集方法:

1.血清：全血样品于室温放置 2 小时或 4°C 过夜后于 1000×g 离心 20 分钟，取上清即可检测，收集血液的试管应为一次性的无热原，无内毒素试管。

2.血浆：抗凝剂推荐使用 EDTA-Na₂，样品采集后 30 分钟内于 1000×g 离心 15 分钟，取上清即可检测。避免使用溶血，高血脂样品。

3.组织匀浆：用预冷的 PBS (0.01M, pH=7.4)冲洗组织，去除残留血液（匀浆中裂解的红细胞会影响测量结果），称重后将组织剪碎。将剪碎的组织与对应体积的 PBS（一般按 1:9 的重量体积比，比如 1g 的组织样品对应 9mL 的 PBS，具体体积可根据实验需要适当调整，并做好记录。推荐在 PBS 中加入蛋白酶抑制剂）加入玻璃匀浆器中，于冰上充分研磨。为了进一步裂解组织细胞，可以对匀浆液进行超声破碎，或反复冻融。最后将匀浆液于 5000×g 离心 5~10 分钟，取上清检测。

4.细胞培养上清：取细胞培养上清于 1000×g 离心 20 分钟，除去杂质及细胞碎片。取上清检测。

5.其它生物样品：1000×g 离心 20 分钟，取上清即可检测。

6.样品应清澈透明，悬浮物应离心去除。

7.样品收集后若在 1 周内进行检测的可保存于 4°C，若不能及时检测，请按一次使用量分装，冻存于-20°C(1 个月内检测)，或-80°C (6 个月内检测)，避免反复冻融。

8.如果您的样品中检测物浓度高于标准品最高值，请根据实际情况，做适当倍数稀释（建议先做预实验，以确定稀释倍数）。

检测前准备工作:

1.请提前 20 分钟从冰箱中取出试剂盒，将各组分平衡至室温。

2.洗涤液配制：将浓缩洗涤液用双蒸水稀释(1:25)。未用完的放回 4°C。从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶，属于正常现象，可用 40°C 水浴微加热使结晶完全溶解后再配制洗涤液（加热温度不要超过 50°C，使用时洗涤液应为室温），当日现配现用。

3.标准品配制：**瓶身标注有标准品含量**：标准品为冻干品，使用前用 PBS 或者去离子水复溶到 0.5ml（此时标准品浓度为 C₀），然后根据需要，取适量标准品用**通用稀释液**进行 1：2 倍比稀释（注：不要直接在反应孔中进行倍比稀释）。建议配制成以下浓度：C₀、C₀/2、C₀/4、C₀/8、C₀/16、C₀/32、C₀/64，样品稀释液直接作为空白孔 0。

例如：标准品管标注为 500ng/ mL 水溶，加水 0.5ml 复溶，此时 C₀=50ng/ml，用**通用稀释液**进行 1：2 倍比稀释最为标准品的浓度依次为 500ng/ml,250 ng/ml, 125 ng/ml, 62.5 ng/ml, 31.3 ng/ml, 15.6 ng/ml, 7.8 ng/ml, 0 ng/ml（稀释液作为空白对照）

4. **检测抗体工作液**：实验前计算当次实验所需用量（以 **100μL/孔**计），检测抗体（100×）用**通用稀释液**稀释 100 倍，实际配制时应多配制 100-200μL；

5. **链霉亲和素 HRP 工作液**：实验前计算当次实验所需用量（以 **100μL/孔**计），链霉亲和素 HRP（100×）用**通用稀释液**稀

释 100 倍，实际配制时应多配制 100-200 μ L；

6. **TMB 底物液**:使用前，提前放置室温平衡。

酶标板洗涤方法说明:

1. 自动洗板机：每孔加入洗涤液 350 μ L，注入与吸出间隔 60 秒。
2. 手工洗板：甩尽孔内液体，在洁净的吸水纸上拍干，每孔加洗涤液 350 μ L，浸泡 1-2 分钟，吸去（不可触及板壁）或甩掉酶标板内的液体，在厚的吸水纸上拍干。

使用步骤:

实验开始前，各试剂均应平衡至室温；试剂或样品配制时均需充分混匀，并尽量避免起泡。

1. **加样**：分别设空白孔、标准品孔、待测样品孔。空白孔加样品稀释液 100 μ L，标准品孔分别加入依次梯度稀释的标准品，每孔 100 μ L，待测样品孔加待测样品 100 μ L，加完后，酶标板覆膜，37 $^{\circ}$ C 孵育 60 分钟。

注意：为保证实验结果有效性，每次实验请使用新的标准品溶液。

2. **加检测抗体**：弃去孔内液体，甩干，洗板 3 次，每次浸泡 1-2 分钟，350 μ L/每孔，甩干并在吸水纸上轻拍将孔内液体拍干。立即每孔加入配好的**检测抗体工作液** 100 μ L（在使用前 15 分钟内配制），注意不要有气泡，加样时将样品加于酶标板底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀。加完后酶标板覆膜，37 $^{\circ}$ C 孵育 60 分钟。

注意：为保证实验结果有效性，每次实验请使用新鲜配置的检测抗体工作液。

3. **加链霉亲和素 HRP**：弃去孔内液体，甩干，洗板 3 次，每次浸泡 1-2 分钟，350 μ L/每孔，甩干并在吸水纸上轻拍将孔内液体拍干；立即每孔加入配好的**链霉亲和素 HRP 工作液** 100 μ L（在使用前 15 分钟内配制），注意不要有气泡，加样时将样品加于酶标板底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀。给酶标板覆膜，37 $^{\circ}$ C 孵育 45 分钟。

注意：为保证实验结果有效性，每次实验请使用新鲜配置的链霉亲和素 HRP 工作液。

4. **加 TMB 底物显色**：弃去孔内液体，甩干，洗板 3 次，每次浸泡 1-2 分钟，350 μ L/每孔，甩干并在吸水纸上轻拍将孔内液体拍干；每孔加 TMB 底物溶液 100 μ L，酶标板加覆膜，室温避光显色 15 分钟左右（根据实际显色情况酌情缩短或延长，但不超过 30 分钟。当标准孔出现明显梯度时，即可终止）。

5. **终止显色**：每孔加终止液 90 μ L，此时蓝色立转为黄色。终止液的加入顺序应尽量与底物液的加入时序相同。

6. **酶标仪读数**：终止显色后立即用酶标仪在 450nm 波长（630nm 作为参考波长）读取各孔的光密度（OD 值）。

注意：应提前打开酶标仪电源，预热仪器，提前设置好检测程序。

7. **实验试剂归位**：实验完毕后，将未用完的试剂按规定的保存温度放回冰箱保存。

标准曲线绘制及结果计算:

1. 以标准品的浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，绘制标准曲线。如有设置复孔，则应取其平均值计算。
2. 推荐使用专业的曲线制作软件，如 curve expert 1.3 或 1.4，在软件界面既可根据样品 OD 值，由标准曲线查出相应的

浓度，乘以稀释倍数；亦可将样品的 OD 值代入标准曲线的拟合方程式，计算出样品浓度，再乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。

3. 若样品 OD 值高于或者接近标准曲线上限，应适当稀释后重测，计算浓度时应乘以稀释倍数；若样品 OD 值低于或者接近标准曲线下限，应适当浓缩样品后重测，计算浓度时应除以稀释倍数；

注意事项：

1. **试剂盒保存**：试剂盒中各试剂请按说明书提示合理存放。在储存及温育过程中避免将试剂暴露在强光中。所有试剂瓶盖须旋紧以防止蒸发和微生物的污染，否则可能会造成试剂盒性能下降或者失效。
2. **酶标板**：刚开启的酶标板孔中可能会有少许水样物质，此为正常现象，不会对实验结果造成任何影响。暂时不用的板条应拆卸后放入备用铝箔袋，按推荐温度存放！
3. **加样**：加样或加试剂时，第一个孔与最后一个孔的加样时间间隔如果太大，将会导致不同的“预温育”时间，从而明显地影响到测量值的准确性及重复性。每次的加样时间最好控制在 10 分钟内。推荐设置复孔。
4. **温育**：为防止样品蒸发，实验时必须给酶标板覆膜；洗板后应尽快进行下步操作，避免酶标板处于干燥状态；严格遵守给定的温育时间和温度。
5. **洗涤**：洗涤过程中反应孔中残留的洗涤液应在吸水纸上拍干，勿将滤纸直接放入反应孔中吸水。在读数前要注意清除底部残留的液体和手指印，以免影响酶标仪读数。
6. **显色时间的控制**：加入底物后请定时观察反应孔的颜色变化（比如每隔 5 分钟），如梯度已很明显，请提前加入终止液终止反应，避免颜色过深影响酶标仪读数。
7. **底物**：底物请避光保存，在储存和温育时避免强光直接照射。
8. **混匀**：充分轻微混匀对反应结果尤为重要，最好使用微量振荡器(使用最低频率)，如无微量振荡器，可在反应前手工轻轻敲击酶标板框混匀。
9. **安全**：试验中请穿着实验服并带乳胶手套做好防护工作。特别是检测血液或者其他体液样品时，请按国家生物实验室安全防护条例执行。
10. 不同批号的试剂盒组份不能混用（洗涤液和反应终止液除外）
11. 试验中所用的 EP 管和吸头均为一次性使用，严禁混用，否则将影响试验结果！