新冠病毒 S 蛋白中和抗体 ELISA 半定量检测试剂盒

产品简介：

2019 年底，严重急性呼吸系统综合症冠状病毒 2（Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2，SARS-CoV-2）开始肆虐全球，对全人类生命健康造成巨大威胁。该病毒通过刺突蛋白（Spike protein,S）受体结合域（Receptor Binding Domain,RBD）识别细胞表面受体-血管紧张素转化酶 2（Angiotensin I Converting Enzyme 2,ACE2）并与其结合，在相关蛋白协助和介导下侵染细胞。

本试剂盒可检测的中和抗体为针对 S 蛋白并且可以阻断其与 ACE2 结合的抗体；本试剂盒可以检测任何物种体液中针对 S 蛋白的中和抗体。

本试剂盒预包被酶标板上通过共价固定 S 蛋白 RBD 片段，其可以与 HRP-ACE2 偶联物特异性结合，然后通过 TMB 在 HRP-ACE2 偶联物的 HRP 酶催化下显色；如果待检测样本或者标准品中含有针对 S 蛋白中和抗体会阻断 HRP-ACE2 偶联物与固定的 RBD 片段的结合，因此中和抗体含量与 TMB 显色值呈负相关。

本试剂盒可检测血清、血浆或其他体液中针对 S 蛋白的中和抗体，不受待检样品种属和抗体亚型的限制。

虽然本试剂盒中标准品为标准浓度，但是由于不同中和抗体亲和力不同，所以参照本试剂盒标准品测算的中和抗体浓度为相对浓度，因此称为半定量。

主要组分：

组分名称	规格	保存条件	数量
预包被酶标板（共价固定 RBD 片段）	96T	-20℃	1
中和抗体标准品(S 蛋白中和抗体),10ug/ml	300ul/支	-20℃	1
阴性对照品(非相关抗体)	30ul/支	-20℃	1
HRP-ACE2 偶联复合物（100×）	60ul	-20℃	1
通用稀释液	30ml	4℃	1
浓缩洗涤液（25×）	30ml	4℃	1
TMB 底物液	12ml	4℃	1
底物反应终止液	12ml	4℃	1
酶标板覆膜			5
产品说明书			1

储存方法：

请按各个组分对应的温度存储，该试剂盒在各组分未拆封的情况下，自生产之日起可存放 6 个月。

试剂准备：

1.从冰箱中取出所有试剂，在使用前平衡至室温（20℃至25℃）。 未用完后的所有试剂保存在冰箱中。

2.使用前应将所有样品和对照品进行离心。

3.HRP-ACE2 工作液：将**HRP-ACE2 偶联复合物（100×）**用**通用稀释液**按1：100 进行稀释，即为HRP-ACE2 工作液；

4.洗涤液：将**浓缩洗涤液（25×）**用dH_2O 以体积比1:24 进行稀释（稀释25倍），即为洗涤液。

注意：如浓缩洗涤液（25×）中有沉淀，请在水浴（最高 50℃）中温育、混合至沉淀溶解。

中和抗体标准品、阴性对照品和待检样品的准备：

1. 将**中和抗体标准品**用 **通用稀释液** 做连续 2 倍倍比稀释，稀释后**中和抗体标准品**浓度依次为 10ug/ml, 5ug/ml, 2.5ug/ml, 1.25ug/ml, 0.625ug/ml, 0.313ug/ml, 0.156ug/ml,
2. **阴性对照品**用 **通用稀释液** 以体积比 1:9 进行稀释，即稀释 10 倍。
例如，50μL 样品加入 450μL **通用稀释液。**
3. 将待检样品用**通用稀释液**以体积比 1:9 进行稀释，即稀释 10 倍。
例如，10μL 测试样品加入 90μL **通用稀释液。**

预包被酶标板准备及加样顺序安排：

1. 设置**标准品孔、阴性对照品孔**和待检样品孔，最好做两个平行重复孔，有条件的可以做三孔平行重复。
2.根据**标准品孔、阴性对照品孔**和待检样品孔的数量抠取所需酶标板孔条（有条件的可以考虑样品做三次平行重复）。确保板孔条牢固地卡入板框，未使用的板孔条及时装入有干燥剂铝箔袋密封-20℃保存。

检测操作步骤：

1.将稀释好的中和抗体标准品、阴性对照和待检测样品，依次加入酶标板孔，每孔 50ul；
加入标准品孔的标准品浓度依次为： 10ug/ml, 5ug/ml, 2.5ug/ml, 1.25ug/ml, 0.625ug/ml, 0.313ug/ml, 0.156ug/ml, 阴性对照品

2.以上每孔中再立即加入 HRP-ACE2 工作液，每孔 50ul,加完后震荡仪轻轻混匀；
3.用酶标板膜覆封盖板孔，在 37℃ 下孵育 60 分钟；
4.取下平板密封膜，用 350μL 的 洗涤液 洗涤酶标板孔 3 次；
5.洗涤完毕后在吸水纸上拍干孔内液体；
6.每孔立即加入 100uL **TMB 底物液**，室温显色 10-15 分钟，待其显色稳定后立即在每孔加入 50uL **底物反应终止液**

吸光值读取：

提前 10 分钟打开酶标仪，待其预热稳定后方可使用。
将显色反应终止的酶标板放入酶标仪，设定好检测波长 450nm(最好设置双波长：以 450nm 为吸光波长， 630nm 为参考波长)；
TMB 底物反应时间与温度有关，比较适宜温度为 25℃左右；温度太低，反应速度慢，温度高，背景较深，边缘效应严重。

待测样品中和抗体浓度计算：

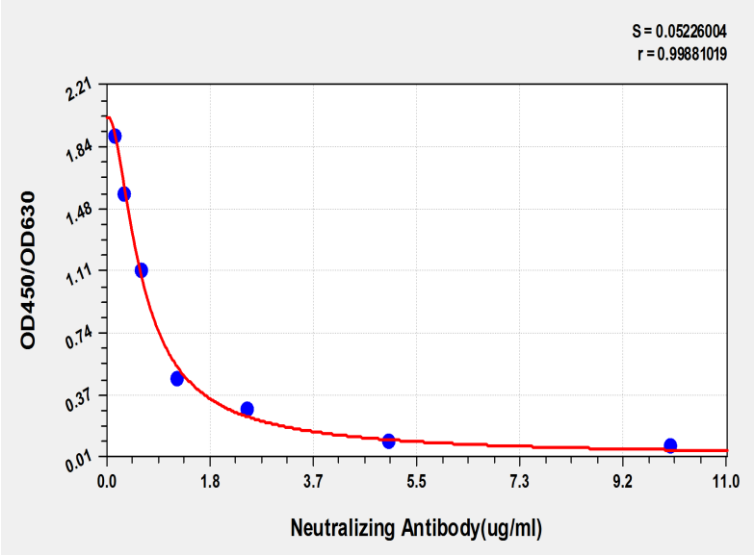
通过标准品浓度及其对应 OD 值建立标准品曲线，将待检样品 OD 值代入拟合曲线公式计算待检样品中中和抗体浓度。

1. 可以使用 Curve Expert 绘制标准曲线，并且通过其拟合曲线公式进行样品浓度计算；
2. 当检测样品 OD 值或者标准品 OD 值高于阴性对照品 OD 值时，应该予以舍弃，不予纳入计算，此可能为样品个体差异所引起的干扰。试剂盒所使用的通用稀释液为标准稀释液，与复杂的体液环境还是有一定差异，所以只有 OD 值低于阴性对照品的 OD 值才纳入计算范围。

典型数据：

中和抗体	**10ug/ml**	**5ug/ml**	**2.5ug/ml**	**1.25ug/ml**	**0.625ug/ml**	**0.313ug/ml**	**0.156ug/ml**	**阴性对照品**

标准品								
OD_{450}	0.078	0.102	0.289	0.475	1.110	1.565	1.906	2.015



***本试剂仅供实验室研究使用**