

甲型流感病毒[Darwin/9/2021(H3N2)]血凝素特异性定量检测试剂盒 (酶联免疫分析法)

【产品名称】

甲型流感病毒[Darwin/9/2021(H3N2)]血凝素特异性定量检测试剂盒（酶联免疫分析法）

【规格】

96 Tests

【货号】

RAS-A210

【预期用途】

本试剂盒可特异性识别甲型流感病毒(Darwin/9/2021(H3N2))血凝素，对甲型流感病毒(Darwin/6/2021(H3N2))血凝素有轻微识别，不识别甲型流感病毒(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/Darwin/9/2021 (H3N2)) Antibody，样本中的HA (Influenza A/Darwin/9/2021 (H3N2))与微孔板上固定的Anti-HA (Influenza A/Darwin/9/2021 (H3N2)) Antibody结合，然后加入Biotin-Anti-HA (Influenza A (H3N2)) 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（OD_{450 nm}、OD_{630 nm}），OD_{450 nm}- OD_{630 nm}与样本中的甲型流感病毒(Darwin/9/2021(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
RAS210-C01	Pre-coated Anti-HA (Influenza A/Darwin/9/2021 (H3N2)) Antibody Microplate	1 plate	固体	2-8°C	2-8°C
RAS210-C02	HA (Influenza A/Darwin/9/2021 (H3N2)) Standard	20 µg	冻干粉	2-8°C	-70°C
RAS210-C03	Biotin-Anti-HA (Influenza A (H3N2)) Antibody	20 µg	冻干粉	2-8°C	-70°C
RAS210-C04	Streptavidin-HRP	10 µg	冻干粉	2-8°C, 避光	-70°C, 避光
RAS210-C05	10×Washing Buffer	50 mL	液体	2-8°C	2-8°C
RAS210-C06	2×Dilution Buffer	50 mL	液体	2-8°C	2-8°C
RAS210-C07	Substrate Solution	12 mL	液体	2-8°C, 避光	2-8°C, 避光
RAS210-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，有效期见外包装盒标签。
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.
RAS210-C02	HA (Influenza A/Darwin/9/2021 (H3N2)) Standard	20 µg	200 µg/mL	100 µL
RAS210-C03	Biotin-Anti-HA (Influenza A (H3N2)) Antibody	20 µg	200 µg/mL	100 µL
RAS210-C04	Streptavidin-HRP	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-HA (Influenza A (H3N2)) Antibody工作液:

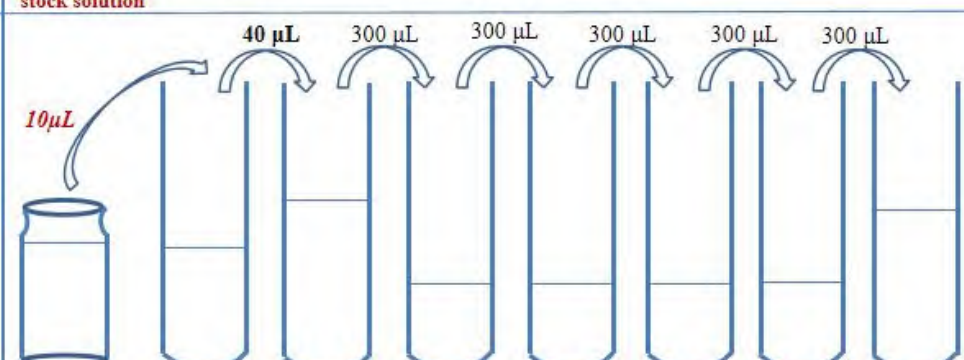
用1×Dilution Buffer将Biotin-Anti-HA (Influenza A (H3N2)) Antibody存储液稀释至0.05 µg/mL，需避光保存，现用现配。

1.4 配制Streptavidin-HRP工作液:

用1×Dilution Buffer将Streptavidin-HRP存储液稀释至0.05 µg/mL, 需避光保存, 现用现配。

2. 制备标准曲线

复溶后标准品(RAS210-C02)的浓度为 **200 µg/mL**, 取 10 µL 的标准品储存液, 加入 490 µL 的稀释液, 作为 Std.-0(4000 ng/mL), 然后取 Std.-0 溶液 40 µL, 加入到 600 µL 的稀释液中, 作为标准曲线的最高浓度 **Std.-1(250 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/9/2021 H3N2) Standard stock solution	Std.-0	Std.-1	Std.-2	Std.-3	Std.-4	Std.-5	Std.-6
Operating								
Solution Con.	200µg/mL	4000 ng/mL	250 ng/mL	125 ng/mL	62.5 ng/mL	31.25 ng/mL	15.625 ng/mL	7.813 ng/mL
Dilution Buffer Vol.		490 µL	600 µL	300 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, 37°C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, 共洗板 3

次。每次洗板后，需在吸水纸上拍干。

6. 加 Biotin-Anti-HA (Influenza A (H3N2)) Antibody 工作液

在对应板孔内加入 100 μ L 的 Biotin-Anti-HA (Influenza A (H3N2)) Antibody(稀释至 0.05 μ g/mL)工作液，该工作液现用现配，依次重复操作步骤 4 孵育及步骤 5 洗板。

7. 加 Streptavidin-HRP 工作液

在对应板孔内加入 100 μ L 的 Streptavidin-HRP(稀释至 0.05 μ g/mL)工作液，该工作液现用现配，避光保存，依次重复操作步骤 4 孵育及步骤 5 洗板。

8. 显色

将微孔板拍干，每孔加入 100 μ L Substrate Solution。用封板膜封板，37°C避光孵育 20 min。

9. 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。

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 OD_{450 nm} 扣除 OD_{630 nm} 读值可降低背景干扰。

【结果分析】

1. 标准曲线 R² 应大于 0.9900，检测范围为 7.813-250 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。

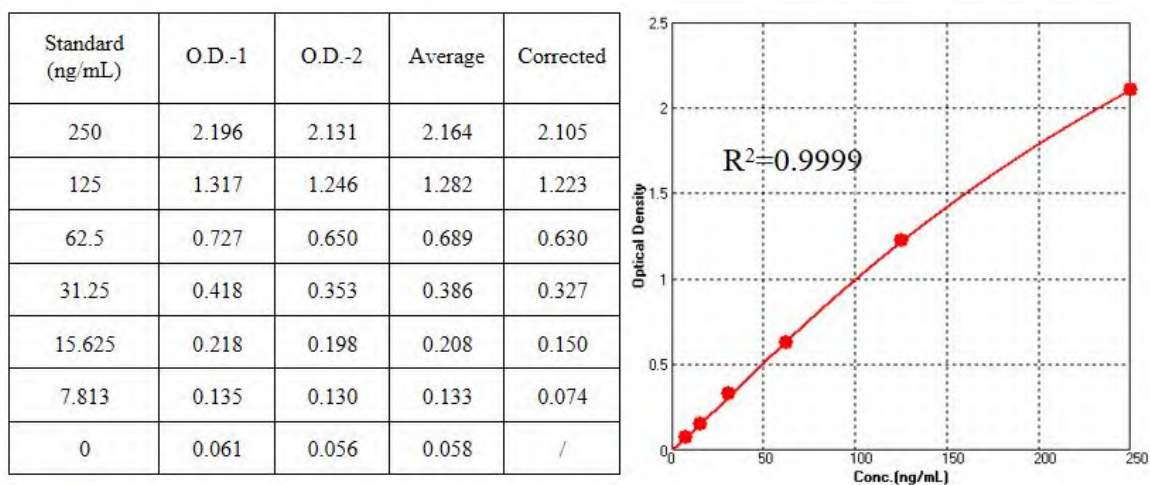
【注意事项】

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°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。



【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)	157.404	43.829	17.857	156.585	44.862	18.399
标准差	4.395	2.310	1.064	0.798	0.898	0.527
变异系数(%)	2.8	5.3	6.0	0.5	2.0	2.9

【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	99.1	85.6-110.5
中	98.6	92.9-106.8
低	102.8	92.9-112.5

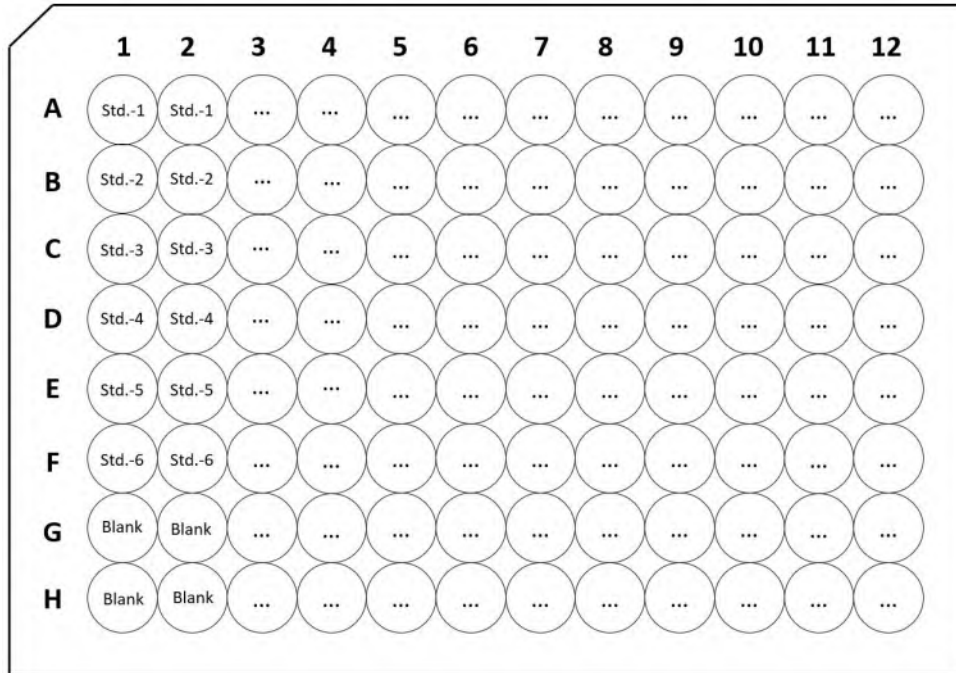
【稀释线性】

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%	82.6	85.5
	范围(%)	80.7-84.4	82.8-86.7
1:4	平均回收率%	82.9	90.6
	范围(%)	80.5-86.4	86.2-93.9
1:8	平均回收率%	83.1	96.6
	范围(%)	80.9-86.3	88.8-100.5
1:16	平均回收率%	84.6	98.0
	范围(%)	81.3-88.1	90.4-102.9

【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；	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

	<p>(7) 试剂盒没有充分平衡；</p> <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>试剂已平衡至室温（20-25℃）；</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>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>

	<ul style="list-style-type: none"> (8) 过早稀释 (9) 使用用过的封板胶纸 (10) 加入的体积不正确 (11) 不同批号试剂盒中组分混用; 	
3.空白背景高	<ul style="list-style-type: none"> (1) 洗板不干净; (2) 试剂过期; (3) 洗涤不充分; (4) 阴性对照孔被阳性对照或样品污染; (5) 蒸馏水受酶等污染; (6) 试剂混用; (7) 试剂配制浓度有误, 如酶的浓度过高; (8) 孵育温度过高或反应时间过长; (9) 显色时间过长; (10) 底物在使用前曝光; (11) 读板前停留时间过长; 	<ul style="list-style-type: none"> a. 浓缩洗液准确配制: 10×Washing Buffer 如有结晶则应让结晶于室温全部溶解后再量取稀释; b. 使用保质期内试剂; c. 充分洗涤, 彻底拍干; 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; e. 使用新鲜蒸馏水; f. 不同批号试剂勿混用; g. 请按说明书所示稀释倍数配制; 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	<ul style="list-style-type: none"> (1) 蒸发; (2) 温度不均匀; 	<ul style="list-style-type: none"> 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;

<p>5. 标准曲线良好，但样本无检测信号</p>	<p>(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。</p>	<p>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。</p>
---------------------------	---	---