

# SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Nucleoprotein ELISA Kit

Catalog Number: BSKV0001

本试剂盒用于定量检测细胞培养上清液及细胞提取物等样本中 SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Nucleoprotein 含量。**使用前请仔细阅读说明书并检查试剂组分**，如有任何疑问请与北京博奥森生物技术有限公司联系，公司将为您提供强有力的技术支持。

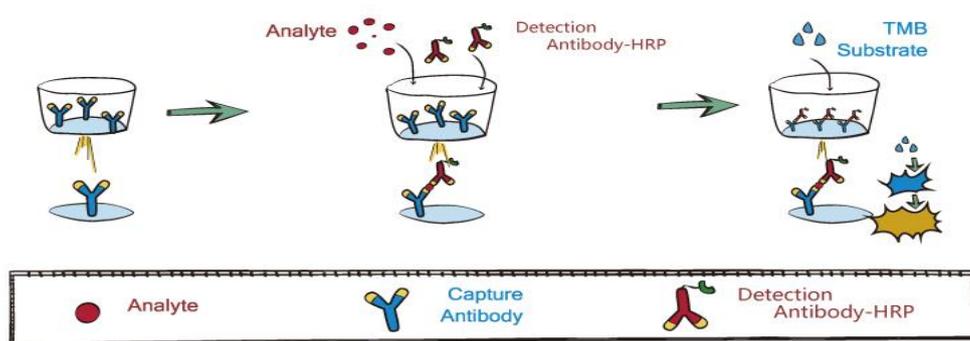
***仅供研究，不用于临床诊断。***

## 目录

检测原理.....	3
试剂盒组成.....	3
其它实验材料.....	3
注意事项.....	4
样本收集、处理及保存方法.....	4
试剂准备.....	5
操作步骤.....	5
结果判断.....	6
试剂盒性能.....	7
检测范围.....	7
灵敏度.....	7
常见问题分析及解决办法.....	8

### 检测原理:

本试剂盒采用 ELISA 双抗体夹心法原理。用纯化的 SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Nucleoprotein 抗体包被微孔板, 向已包被板微孔中依次加入标准品及待测样本, 同时加入 HRP 标记的 SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Nucleoprotein 抗体, 形成抗体-抗原-酶标检测抗体复合物, 经过彻底洗涤后加入底物 TMB 显色。TMB 在 HRP 酶的催化下转化下成蓝色, 并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的 SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Nucleoprotein 呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光值(OD 值), 通过绘制标准曲线计算样品中 SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Nucleoprotein 浓度。



### 试剂盒组成:

试剂盒组成	规格 (96T)	保存条件
抗体包被板条	8×12	2-8℃保存
标准品	1 ml×2 瓶	2-8℃保存
S1 标准品/样本稀释液	15 ml×1 瓶	2-8℃保存
检测抗体浓缩液 (100×)	30μl×2 瓶	2-8℃保存
S2 检测抗体稀释液	15ml×1 瓶	2-8℃保存
浓缩洗涤液 (20×)	30ml×1 瓶	2-8℃保存
显色底物 (避光)	12ml×1 瓶	2-8℃保存
终止液	6ml×1 瓶	2-8℃保存
封板胶纸	4 张	
说明书	1 份	

### **其它实验材料（不提供，但可协助购买）：**

- 1.酶标仪(主波长 450nm, 参考波长 630nm)
- 2.高精度可调移液器（已校准）及吸头：0.5-10,2-20,20-200,200-1000 $\mu$ l。  
一次检测样本较多时，建议使用多通道移液器。
- 3.自动洗板机或洗瓶
- 4.微量振荡器
- 5.双蒸水或去离子水
- 6.坐标纸
- 7.量筒

### **注意事项：**

- 1.试剂盒保存在 2-8 $^{\circ}$ C，未用完的标准品，建议丢弃。不可混合使用不同来源或不同批号的试剂盒组分，请在有效期内使用本产品。
- 2.浓缩洗涤液低温取出可能会伴有结晶析出，稀释时可在水浴中加热助溶，不影响使用。
- 3.各步加样均应使用移液器，并经过校准，以免产生误差。建议一次加样时间最好控制在 5 分钟内，如样本数量较多，推荐使用排枪加样。
- 4.请每次测定的同时做标准曲线，最好做复孔。如样本中待测物质含量高于试剂盒检测上限（样本 OD 值大于标准品孔第一孔的 OD 值），请先用样本稀释液稀释一定的倍数（n 倍）后再测定，计算时需乘以总稀释倍数。
5. 为避免交叉污染，在加入不同浓度的标准品、不同样本、不同试剂时谨记及时更换吸头，封板胶纸只限一次性使用。
- 6.浓缩酶结合物及显色底物请避光保存，显色底物在添加之前，应保持无色，请勿使用已变为蓝色的显色底物。
- 7.严格按照说明书的操作进行，试验结果判定必须以酶标仪读数为准。

### **样本收集、处理及保存方法：**

- 1.细胞上清液：将培养基移至离心管内，于 4 $^{\circ}$ C 下，1500rpm 离心 10 分钟，取上清进行分装并在 -80 $^{\circ}$ C 下保存样品，尽可能减少反复冻融次数。
- 2.细胞提取物：吸取培养基并用预冷 PBS 洗涤细胞一次，吸出 PBS，在 100 mm 培养板加入 0.5ml 提取缓冲液。收集细胞至经过预冷的离心管中，短暂涡旋后在冰上孵育 15-30 分钟，于 4 $^{\circ}$ C 下 13000rpm 离心 10 分钟，将上清液（这里是指可溶性细胞提取物）分装至预冷的离心管中，并于 -80 $^{\circ}$ C 保存，尽可能减少反复冻融次数。

提取缓冲液：100 mM Tris (pH 7.4)、150 mM NaCl、1 mM EGTA、1 mM EDTA、1% Triton X-100、0.5% 脱氧胆酸钠、磷酸酶抑制剂混合物、蛋白酶抑制剂混合物、PMSF。

3.若样本无法立即检测，请将其按最小使用量分装， $-20^{\circ}\text{C}$  —  $-80^{\circ}\text{C}$ 保存，避免反复冻融。如果样本中含有大量颗粒，检测前先离心或过滤去除；室温下解冻，请勿于  $37^{\circ}\text{C}$  或更高的温度加热解冻。

4.不能检测含  $\text{NaN}_3$  的样本，因  $\text{NaN}_3$  抑制辣根过氧化物酶的活性。

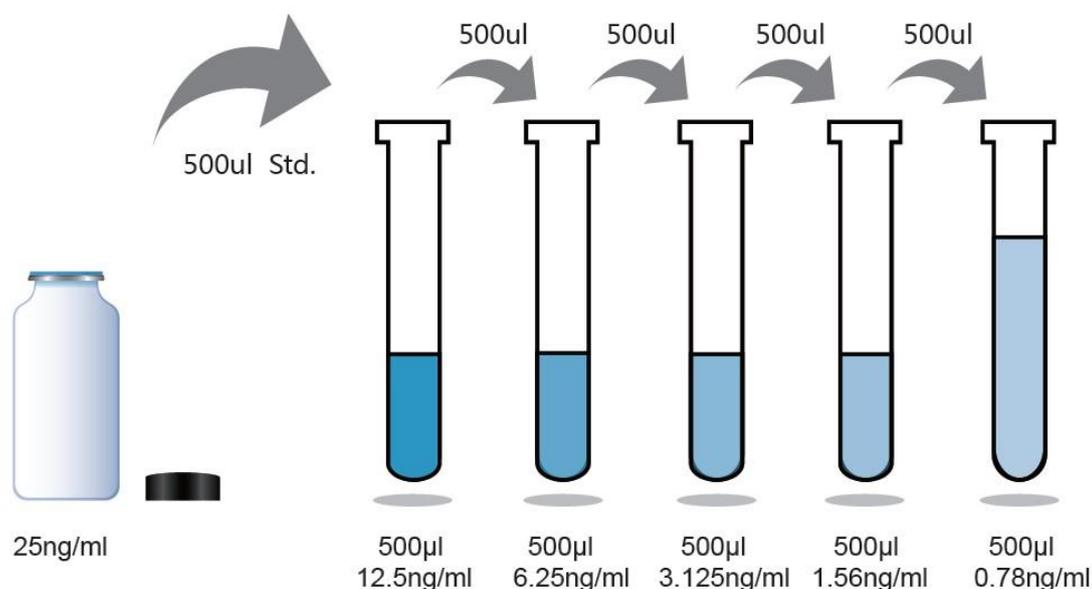
5.请根据实际情况，将样本做适当倍数稀释（建议根据预试验结果确定稀释倍数）。

### **试剂准备：**

1.试剂回温：请在实验前 30min 内，将试剂盒和待测样本置于室温下回温。

2.洗涤液配制：根据浓缩洗液的浓缩倍数，用双蒸水或去离子水进行相应倍数稀释后备用。

3.标准品梯度稀释：取出试剂盒提供的标准品（ $25\text{ng/ml}$ ），然后取 5 只聚丙烯试管，各加入  $500\mu\text{l}$  标准品/样本稀释液（S1），按照以下浓度进行 2 倍稀释： $25$ 、 $12.5$ 、 $6.25$ 、 $3.125$ 、 $1.56$ 、 $0.78\text{ ng/ml}$  进行稀释。 $25\text{ng/ml}$  为标准曲线最高点浓度，标准品/样本稀释液（S1）作为标准曲线的零点（ $0\text{ng/ml}$ ）。使用过的标准品原液（ $25\text{ng/ml}$ ）未用完的应废弃或根据需要按照一次用量分装，并将其贮存在  $-20\sim -80^{\circ}\text{C}$  冰箱。



4. 检测抗体工作液：根据试验所需用量，用检测抗体稀释液（S2）将检测抗体浓缩液（ $100\times$ ）稀释成1倍应用工作液，请于30min内使用。

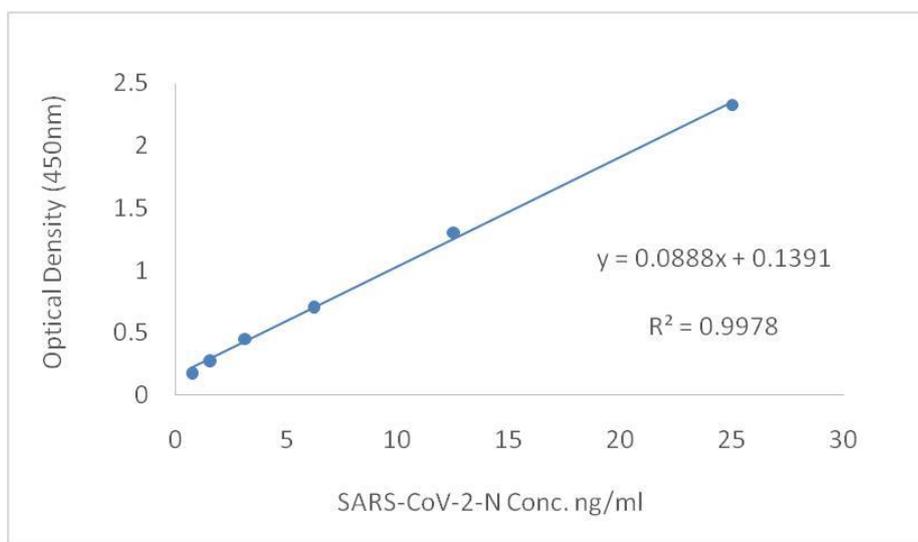
### **操作步骤：**

1.加样：根据试验所需用量，取出相应抗体包被板条，分别将已配制好的标准品、标准品零点（S1）及待测样本以  $50\mu\text{l}$ /孔加入实验孔底部，尽量不触及孔壁，同时，各实验孔加入检测抗体工作液（ $50\mu\text{l}$ /孔），充分混匀。

- 2.温育：用封板膜封板后置 37°C温育 90 分钟。
- 3.洗涤：小心揭掉封板膜，弃去液体，甩干，每孔加满洗涤液，静置 30 秒后弃去，如此重复 5 次，拍干。
- 4.显色：每孔加入 100μl 显色底物，用封板胶纸封板后室温显色 10-20min。
- 5.终止：每孔加终止液 50μl（此时蓝色立转黄色）。
- 6.测定：用酶标仪 450nm 波长测定各孔的吸光度 (OD 值)，测定应在加终止液后 5min 以内进行。

### **结果判定：**

- 1.建议采用双波长读数，即每个标准品和样本的 450nm OD 值减去 630nm OD 值，为最终数值，如果做复孔,求其平均值。
2. 使用计算机软件以吸光度 OD 值为纵坐标(Y)，相应的 SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Nucleoprotein 标准品浓度为横坐标(X)，生成标准曲线，样本的 SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Nucleoprotein 含量可根据其 OD 值由标准曲线换算出相应的浓度。若样本 OD 值高于标准品曲线上限，请做适当倍数稀释，计算样本浓度时需乘以相应稀释倍数。



本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线为准

### **试剂盒性能：**

批内与批间差应小于 10%

### **检测范围：**

0.78 ng/ml -25 ng/ml

### **灵敏度：**

0.4 ng/ml

## 常见问题分析及解决办法

问题	可能原因	解决办法	
无颜色	不同试剂盒或不同批号的试剂混合	重新检查试剂的标签，确准所有组分都属于正使用的试剂盒中的。不能混用不同试剂盒或不同批号的试剂。	
	漏加抗体、酶、显色剂	检查操作流程，注意不要漏加	
	HRP 酶污染了叠氮钠	使用新配制的试剂，禁含叠氮钠	
	试剂配制/使用有误	重做试验，严格按说明书操作，每次配制和使用前看清标签	
显色弱	超过有效期的产品可能会产生很弱的信号	检查产品有效期	
	缩短孵育时间能使实验信号变弱	检查孵育时间	
	使用了被污染的试剂	检查试剂是否被污染	
	仪器设定不正确，滤光片不匹配	仪器是否设定正确，滤光片的使用等	
	洗涤操作不规范	洗涤不充分，使用手工洗板常出现	
		洗瓶洗涤，每孔应完全充满洗涤缓冲液，倾出时应迅速	
		若用洗板机，应校准并设定足够充满每孔的体积量。板内侧不应接触设备	
检查每孔是否有残留的洗液或每孔加样量的体积是否准确			
可在两次洗板之间加 30 秒的浸泡			
高背景	实验中孵育温度和时间不适当	确定每一试验步骤的孵育温度和时间是否适当	
	酶加量过多	加酶前验看移液器调节量是否准确	
		检查稀释度，若必要进行效价测定	
标曲佳但样本孔无信号	样本中靶标物含量低或样本中无靶标物	设置阳性对照，重复实验	
	样本基质效应影响检测	重新稀释样本后复测	
标曲佳但样本信号偏高	样本中待检物含量超过标准曲线范围	重新稀释样本后复测	