

禽白血病抗原 ELISA 检测试剂盒使用说明书

【用途】

本试剂盒用于检测蛋清、泄殖腔棉拭子和细胞分离病毒上清样品中的禽白血病病毒（Avian Leukosis Virus, ALV）抗原。

【原理】

本试剂盒使用抗 p27 抗体包被微量反应板，利用夹心 ELISA 原理进行检测。如果待测样品中含有 ALV，则与包被抗体结合，加入辣根过氧化物酶标记的抗 p27 抗体（酶结合物）后，形成抗体-抗原-酶标抗体复合物，再加入 TMB 底物液作用显色，在酶标仪 650nm 波长测定各孔吸光度值，判定结果。

【试剂盒组成】

名 称	数 量	数 量
1. ALV 抗体包被板	2 块 (8×12 孔)	5 块 (8×12 孔)
2. 10 倍浓缩洗涤液	1 瓶 (125mL)	2 瓶 (200mL/瓶)
3. ALV 阴性对照	1 支 (0.9mL)	1 支 (1.8mL)
4. ALV 阳性对照	1 支 (0.9mL)	1 支 (1.8mL)
5. ALV 酶结合物	1 瓶 (24mL)	1 瓶 (55mL)
6. 底物液 A	1 瓶 (12mL)	1 瓶 (30mL)
7. 底物液 B	1 瓶 (12mL)	1 瓶 (30mL)
8. 终止液	1 瓶 (24mL)	1 瓶 (55mL)
9. 一次性封板膜	4 张	10 张
10. 自封袋(干燥剂)	1 个	1 个
11. 说明书	1 份	1 份

【其它需自备的物品】

1. 50uL 和 100uL 的精确微量移液器，200uL 八或十二通道微量移液器；
2. 一次性移液器吸头；
3. 稀释用 96 孔板；
4. 37℃ 孵育箱；
5. 1000mL 量筒（配制洗涤液用）；
6. 酶标仪（含 650nm 波长滤光片）；
7. 蒸馏水或去离子水；
8. 自动或手动洗板系统；
9. 吸水纸。

【注意事项】

1. 试剂盒从冷藏环境中取出后，应置室温下平衡至少 30 分钟后再使用；
2. 吸取每个样品后都要更换吸头；
3. 加液时均应使用加液器并经常校对其准确性，以减少试验误差；
4. 待检样品数量较多时，应使用八或十二通道微量移液器，从稀释板转移到反应板中，缩短加样时间；
5. 洗涤时各孔均需加满洗涤液，防止因洗涤不充分造成非特异性显色；
6. 封板膜只限一次使用，以避免交叉污染；
7. 结果判定必须以酶标仪读数为准，且终止反应后应立即读数，在 10 分钟内完成；

8. 所有样品、洗涤液和各种废弃物都应灭活处理；
9. 不同批次试剂不能混用；
10. 底物 B 液中含有 TMB 成份，对强光和氧化剂敏感，应尽量避免；
11. 终止液为 SDS 溶液，使用前恢复室温，防止出现结晶；
12. 请严格按照实验操作步骤操作。

【样品制备】

蛋清样品——收集蛋清，冻融两次后用稀释液(1×洗涤液) 1:1 稀释，吸取 100μl，加到 ELISA 反应板中。

泄殖腔棉拭子（胎粪）——将泄殖腔棉拭子（胎粪）加到 1ml 稀释液(1×洗涤液)中，反复冻融两次。检测前，将样品恢复至室温，沉淀杂质，吸取 100μl 上清，加到 ELISA 反应板中。

细胞分离病毒上清——将抗凝血用 DF-1（鸡胚成纤维细胞系）或 CEF（鸡胚成纤维细胞）培养后，将培养物冻融两次，轻轻拍匀，吸取 100μl 上清，加到 ELISA 反应板中。

注意：阴性和阳性对照无需稀释。

【洗涤液或稀释液配制】

使用前，浓缩的洗涤液应恢复至室温（25℃左右），并摇动使沉淀的盐溶解，然后用蒸馏水或去离子水作 10 倍稀释（例如：每板用 40 ml 浓缩液加上 360ml 水），即稀释液（1×洗涤液）。

【操作步骤】

使用前所有试剂应恢复至室温（25℃左右），试剂应轻轻旋转或振荡混匀。

1. 取出反应板，在记录表上记录阳性对照、阴性对照和样品的位置；
2. 分别在相应孔中加入阳性对照（2 孔）和阴性对照（2 孔）（**不用稀释**）、稀释好的待检样品各 100μl。充分混匀后，贴上封板膜，置 37℃ 孵育 60 分钟；
3. 小心揭掉封板膜，弃去各孔中液体、拍净。每孔加满洗涤液，静置约 30 秒，重复洗涤 5 次，最后在吸水纸上拍净；
注：蛋清样品在洗涤时应特别注意，第一次加入洗液后浸润 5 分钟，再洗涤 4 次时不必再浸泡 5 分钟。
4. 每孔加入酶结合物溶液 100μl，贴上封板膜，置 37℃ 孵育 60 分钟；
5. 重复洗涤 6 次；
6. 每孔加入底物液 A 50μl 和底物液 B 50μl，轻轻振荡混匀，置 37℃ 避光显色 15 分钟；
7. 每孔加入终止液 100μl，轻轻振荡混匀，置酶标仪 650nm 波长处测定各孔 OD 值。

【结果判定】

1. 试验结果同时符合下列条件，方为有效：
 - ① 两孔阴性对照 OD₆₅₀ 平均值应 < 0.10；
 - ② 两孔阳性对照 OD₆₅₀ 平均值应 ≥ 0.45；
2. 计算公式：
$$S/P = (\text{样品 OD}_{650} \text{ 值} - \text{阴性对照平均值}) / (\text{阳性对照平均值} - \text{阴性对照平均值})$$
3. 按以下方法判定结果：
 - ① 阳性：**S/P 值** ≥ 0.2，即禽白血病抗原阳性。
 - ② 阴性：**S/P 值** < 0.2，即禽白血病抗原阴性。

【贮藏条件】2-8℃ 避光保存

【保存期】该产品有效期 12 个月

地址：北京市海淀区北清路 68 号院中区 13 号楼东侧

电话：010-82898320

E-mail: elisa@anheal.com