

口蹄疫病毒 O 型结构蛋白抗体 ELISA 检测说明书 兽用

【预期用途】

本试剂盒采用阻断 ELISA 方法，检测猪血清或血浆样本中的口蹄疫病毒 O 型结构蛋白抗体。

【检测意义】

口蹄疫为口蹄疫病毒所引起的偶蹄动物的一种急性、热性、高度接触性传染病。在流行区域，免疫接种口蹄疫灭活疫苗预防疫病，抗口蹄疫病毒中和抗体的滴度与免疫保护成正相关。因此，特异性检测血清中和抗体效价是预防口蹄疫疫病重要一步。

【检测原理】

口蹄疫病毒 O 型结构蛋白抗体 ELISA 检测试剂盒包括：FMDV 重组结构蛋白包被的微孔板，样品做 20 倍稀释后加入到微孔板中，固相抗原与样品中抗体发生特异性结合，洗涤，加入 HRP 标记的抗口蹄疫特异性单克隆抗体即标记物，下一步，标记物与余留固相抗原结合形成抗原抗体复合物。最后，加入 TMB 显色，通过 450_{nm} 酶标仪读取光密度值(OD)，并计算每份样本中口蹄疫抗体的阻断率即 PI 值。

【试剂盒组份】

	组份	规格	规格
1	FMDV SP ELISA 包被板	1 板，12*8 孔	5 板，12*8 孔
2	阳性对照（PC）	1 支*0.06ml	1 支*0.3ml
3	阴性对照（NC）	1 支*0.06ml	1 支*0.3ml
4	稀释液	1 瓶*25ml	1 瓶*125ml
5	20 倍浓缩洗涤液	1 瓶*25ml	1 瓶*125ml
6	20 倍酶结合液	1 支*0.6ml	1 瓶*3.0ml
7	终止液	1 瓶*12ml	1 瓶*60ml
8	TMB 底物液	1 瓶*12ml	1 瓶*60ml
9	盖板膜	1 张	5 张
10	说明书	1 张	1 张

【注意事项】

- 1、 严格按说明书操作。
- 2、 不能使用过期试剂盒，不同批次试剂盒不能混用。
- 3、 TMB 变为蓝色不能使用，使用 TMB 剩余部分不能倒回原瓶。
- 4、 操作本实验时，操作者戴一次性手套；穿工作服；
- 5、 检测样本都应按“传染物”规定处理，严格健全和执行消毒隔离制度，检测完成后做好场所消毒。

【样品要求】

血清、血浆：避免溶血，短期储存，2-8℃可存放 1 周，长期存放，-20℃或以下温度储存，避免反复冻融。

【操作规程】 确保试剂盒完整无损，操作前，需将试剂盒恢复到室温（25℃左右）。

样品反应:

- 1、 每孔加入 95μL 稀释液
- 2、 A1 和 B1 孔各加入 5μL 阴性对照
- 3、 C1 和 D1 孔各加入 5μL 阳性对照
- 4、 加入 5μL 样本到其余孔中
- 5、 盖板膜盖板并轻微震荡混匀
- 6、 22℃-28℃反应 1 小时

洗液:

洗液配制:将 20 倍浓缩洗涤液用双蒸水或去离子水做 20 倍稀释(例如:15ml 20 倍浓缩洗涤液与 285ml 双蒸水或去离子水混匀后使用)

酶结合物液:

酶结合物液:将 20 倍酶结合液用稀释液做 20 倍稀释(例如:0.6ml 20 倍酶结合液与 11.4ml 稀释液混匀后使用)

酶结合抗体反应:

- 1、 洗板:甩净孔中液体,将洗液注满每孔(约 250μl/孔),甩净拍干,反复 3 次;
- 2、 排净孔内液体,每孔加入 100μL 酶结合物液;
- 3、 盖板膜覆盖板孔,轻轻震动混匀;
- 4、 22℃-28℃避光反应 30 分钟;

显色和读取结果:

- 1、 洗板:甩净孔中液体,将洗液注满每孔(约 250μl/孔),甩净拍干,反复 3 次;
- 2、 排净孔内液体,每孔加入 100μL TMB 底物液;
- 3、 22℃-28℃避光反应 15 分钟;
- 4、 终止:每孔 100μL 终止液;
- 5、 读数:波长 450nm 酶标仪进行读数。

【检测结果的解释】

$$PI(\%) = 100 - \frac{\text{样品 OD}_{450}}{NC_{x450}} \times 100$$

- 1、 阴性对照平均值必须 ≥ 1.0
- 2、 阳性对照 PI 值必须大于 50%
- 3、 阴性结果:PI 值 $< 50\%$,说明此份样本的抗 FMDV 抗体效价低于中和抗体效价 64x
- 4、 阳性结果:PI 值 $\geq 50\%$,说明此份样本的抗 FMDV 抗体效价高于中和抗体效价 64x

备注:

若阴性对照平均值 < 1.0 ,可能是 TMB 底物温度低,因此,实验前必须确保 TMB 底物恢复室温后使用。

【储存条件及有效期】

2℃~8℃避光保存,试剂盒外包装明确注明效期。

拆封后未用完的微孔板应用盖板膜封闭好,放入铝箔袋中,2℃~8℃保存。下一次使用前请恢复至室温(25℃左右)。