

口蹄疫病毒非结构蛋白抗体单抗阻断 ELISA 试剂盒说明书

【用途】

猪、牛、羊及其它动物口蹄疫病毒（FMDV）感染的检测与检疫，口蹄疫病毒灭活疫苗免疫与自然感染的鉴别诊断等。

【原理】

口蹄疫病毒（FMDV）非结构蛋白（NS）是病毒在复制过程中产生的蛋白。在自然感染的情况下，动物会产生抗非结构蛋白的抗体。通过检测血清中口蹄疫病毒非结构蛋白抗体，可以区分自然感染动物与灭活疫苗免疫的动物，从而确定动物群体中口蹄疫病毒的感染情况。

本试剂盒采用阻断 ELISA 方法检测血清中的口蹄疫病毒非结构蛋白抗体（IgG 和 IgM）。在聚苯乙烯微孔酶标板上，包被基因工程表达的口蹄疫病毒非结构蛋白。待检血清中的 FMDV-NS 抗体与包被抗原结合，从而阻断 HRP 标记的 FMDV-NS 单克隆抗体与包被抗原的反应，再加 TMB 底物作用显色，在酶标仪 450nm 处测定各孔 OD 值，计算各样品的阻断率，判定结果。

【试剂盒组成】

名 称	96 头份
1. FMDV 抗原反应板	1 块（8 X 12 孔）
2. 20 倍浓缩洗涤液	1 瓶（30mL）
3. FMDV 阴性对照	1 支（1.6mL）
4. FMDV 阳性对照	1 支（1.2mL）
5. FMDV 样品稀释液	1 瓶（15mL）
6. FMDV 酶结合物液	1 瓶（12mL）
7. 底物液 A	1 瓶（8mL）
8. 底物液 B	1 瓶（8mL）
9. 终止液	1 瓶（8mL）
10. 一次性封板膜	2 张
11. 自封袋(干燥剂)	1 个
12. 说明书	1 张

【其它需自备的物品】

1. 量程为 100μl 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℃ 避光孵育箱；
5. 1000mL 量筒（配制洗涤液用）；
6. 振荡器；
7. 酶标仪（含 450nm 波长滤光片）；
8. 蒸馏水或去离子水；
9. 自动或手动洗板系统；
10. 吸水纸。

【注意事项】

1. 试剂盒从冷藏环境中取出后，应恢复至室温后再使用；未用完的抗原包被板加干燥剂放于自封袋中，置 2-8℃ 保存；
2. 吸取每个血清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. 待检血清样品数量较多时，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，以便缩短加样时间；
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，且终止反应后应在 10 分钟内测定其 OD₄₅₀ 值；
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，应尽量避光；
11. 终止液为 2M H₂SO₄，应避免与眼、皮肤接触；

12. 请严格按照实验操作步骤操作；严格控制反应温度和时间；可对样品设置重复取平均值，以减小操作误差的影响。

【样品制备】

取动物全血，按常规方法制备血清，要求血清清亮，无溶血。

【洗涤液配制】

使用前，浓缩洗涤液应恢复至室温，并摇动使沉淀的盐溶解，然后用蒸馏水或去离子水作 20 倍稀释(例如：每板用 30mL 浓缩液加上 570mL 水)。

【样品稀释】

在稀释板上按 1: 1 的体积比稀释待检血清（100μl 样品稀释液 + 100μl 待检血清）。

注意：阴性和阳性对照不须稀释。

【操作步骤】

使用前所有试剂应恢复至室温（20℃-30℃），试剂应轻轻旋转或振荡混匀。

1. 取出 FMDV 抗原反应板，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（3 孔）原液（不用稀释）、稀释好的待检血清各 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；
4. 每孔加入酶结合物液 100μl，贴上封板膜，置 37℃ 孵育 30 分钟；
5. 重复步骤 3；
6. 每孔加入底物液 A 50μl，再加入底物液 B 50μl，轻振混匀，置 37℃ 避光显色 10 分钟；
7. 每孔加入终止液 50μl，轻振混匀，置酶标仪 450nm 波长处测定各孔 OD₄₅₀ 值。

【结果判定】

1. 试验结果同时符合下列条件，方为有效：
 - ① 阴性对照 OD₄₅₀ 平均值 - 阳性对照 OD₄₅₀ 平均值应 ≥ 0.6；
 - ② 阳性对照阻断率均 ≥ 55%；
2. 阻断率（Inh%）的计算：

$$\text{Inh\%} = (\text{阴性对照孔 OD}_{450} \text{均值} - \text{样品孔 OD}_{450} \text{值}) / \text{阴性对照孔 OD}_{450} \text{均值} \times 100\%$$
3. 结果判定：
 - (1) 猪血清样品
 - ① 被检样品 Inh% ≥ 30%，判为 FMDV-NS 抗体阳性；
 - ② 被检样品 20% ≤ Inh% < 30%，判为 FMDV-NS 抗体可疑
 - ③ 被检样品 Inh% < 20%，判为 FMDV-NS 抗体阴性。

(2) 牛、羊以及其它动物血清样品

- ① 被检样品 Inh% ≥ 40%，判为 FMDV-NS 抗体阳性；
 - ② 被检样品 25% ≤ Inh% < 40%，判为 FMDV-NS 抗体可疑；
 - ③ 被检样品 Inh% < 25%，判为 FMDV-NS 抗体阴性。
4. 结果解释
FMDV-NS 抗体阳性，说明该动物曾感染口蹄疫病毒；
FMDV-NS 抗体可疑，说明该动物可能感染口蹄疫病毒；
FMDV-NS 抗体阴性，说明该动物未感染口蹄疫病毒（急性发病期除外）。

【储藏条件】 保存试剂盒于 2-8℃。

【保存期】 该产品有效期为 12 个月。

【生产企业】 哈尔滨元亨生物药业有限公司

【地址】 哈尔滨利民开发区珠海路 1 号

【电话】 0451-55583777