

牛结核 γ -干扰素 ELISA 检测试剂盒使用说明书

【用途】

本试剂盒适用于牛结核病的体外快速诊断，通过检测牛血浆培养物中的 γ 干扰素 (γ -IFN)，诊断牛是否感染牛结核。

【原理】

本试剂盒基于血液 T 淋巴细胞对牛结核分枝杆菌的细胞免疫反应，在 PPD 抗原刺激全血中的淋巴细胞后，未感染牛结核分枝杆菌的淋巴细胞不会产生 γ -IFN，而感染了牛结核分枝杆菌的细胞就能产生 γ -IFN，并通过本试剂盒检测到。同时设立禽型提纯结核菌素 (APPD) 作为对照，排除由禽型结核分枝杆菌引起的反应。

本试剂盒使用抗牛 γ -IFN 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牛 γ -IFN，则与包被抗体结合，加入辣根过氧化物酶标记的抗 γ -IFN 抗体 (牛 γ -IFN 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 450nm 波长测定各孔吸光度值，通过 PBS 刺激样品、BPPD 刺激样品和 APPD 刺激样品 OD 值的差值判定结果。

【试剂盒组成】

名 称	数 量	使 用
检测用：		
1. 牛 γ -IFN 抗体包被板	2 块 (8×12 孔)	可直接使用
2. 10 倍浓缩洗涤液	1 瓶 (120mL)	可直接使用
3. 牛 γ -IFN 阴性对照	1 支 (2.0mL)	可直接使用
4. 牛 γ -IFN 阳性对照	1 支 (2.0mL)	可直接使用
5. 牛 γ -IFN 酶结合物	1 瓶 (24mL)	可直接使用
6. 底物液 A	1 瓶 (15mL)	可直接使用
7. 底物液 B	1 瓶 (15mL)	可直接使用
8. 终止液	1 瓶 (15mL)	可直接使用
9. 一次性封板膜	4 张	
10. 自封袋 (干燥剂)	1 个	
11. 说明书	1 份	
培养用刺激原：		
12. 无菌 PBS	1 支 (7mL)	无菌环境直接使用
13. 牛型提纯结核菌素 (BPPD)	1 支 (7mL)	无菌环境直接使用
14. 禽型提纯结核菌素 (APPD)	1 支 (7mL)	无菌环境直接使用

【试剂盒所需辅助材料】

名 称	数 量	使 用
采血：		
1. 一次性采血针	100 个	每头动物 1 支
2. 肝素锂真空管	100 支	每头动物 1 支
3. 无菌 24 孔培养板	13 个	无菌环境直接使用

备注：如需购买此辅助材料，请于订购单中注明。

【其它需自备的物品】

- 50 μ L 和 100 μ L 的精确微量移液器，200 μ L 八或十二通道微量移液器；
- 一次性移液器吸头；
- 稀释用 96 孔板；

- 37°C 避光孵育箱；
- 1000mL 量筒 (配制洗涤液用)；
- 酶标仪 (含 450nm 波长滤光片)；
- 蒸馏水或去离子水；
- 自动或手动洗板系统；
- 吸水纸。

【注意事项】

- 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；未用完的包被板加干燥剂放于自封袋中，置 2-8°C 保存；
- 吸取每个样品后都要更换吸头；
- 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；
- 待检血浆样品较多时，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；
- 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；
- 封板膜只限一次使用，以避免交叉污染；
- 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；
- 所有样品、洗涤液和各种废弃物都应灭活处理；
- 不同批次试剂不能混用；
- 底物 B 液中含有 TMB 成份，对强光和氧化剂敏感，应尽量避免光；
- 请严格按照实验操作步骤操作。

【样品制备】

1 采血

在牛颈静脉处消毒处理，将一次性采血针扎入牛颈静脉，用肝素锂真空采血管无菌收集至少 5mL 牛血液，轻轻颠倒几次充分混合。采血后 30 个小时内进行培养。注：抗凝血在室温 (22±5°C) 下存放，不能贮存于冰箱中。

2 血液培养

血液培养前轻轻颠倒，充分混匀。由于本试验需要活的淋巴细胞，因此操作过程中应将细胞损伤降至最低。在无菌条件下，将抗凝血加入 24 孔培养板，每头动物加三孔，每孔 1.5mL (见下表)。

吸取血液或刺激原至 24 孔培养板的推荐操作

1 号动物	PBS A1	APPD A2	BPPD A3	2 号动物	PBS A4	APPD A5	BPPD A6
3 号动物	PBS B1	APPD B2	BPPD B3	4 号动物	PBS B4	APPD B5	BPPD B6
5 号动物	PBS C1	APPD C2	BPPD C3	6 号动物	PBS C4	APPD C5	BPPD C6
7 号动物	PBS D1	APPD D2	BPPD D3	8 号动物	PBS D4	APPD D5	BPPD D6

注：PBS = 阴性抗原；APPD = 禽型提纯结核菌素；BPPD = 牛型提纯结核菌素

3 加入刺激原

在无菌条件下，每头动物的三个培养孔中分别加入 100 μ L PBS (阴性抗原对照)、100 μ L APPD 和 100 μ L BPPD。

注：抗原必须与血液充分混匀，最好用一个微量振荡器高速振荡 1min。如果没有合适的仪器，将培养板及其盖紧紧固定在一起，在光滑的表面上顺时针和逆时针各旋转 10 次。小心操作不要引起交叉污染，也不要让血液附在盖上，避免血液起泡。只

有刺激抗原与血液完全混合，试验才能达到最佳效果。

4 孵育

将含有血液和抗原的培养板放于 37°C，CO₂ 湿温培养箱中孵育 16-24 小时。

5 血浆样品的收获

用移液器小心吸取上层血浆约 200μl，转入独立的 1.5mL 离心管中。

注：吸取血浆时应尽量避免吸入细胞。若吸入少量红细胞可进行低速离心去除。

6 血浆的贮存

血浆可在 2-8°C 贮存 7 天，在 -20°C 可贮存几个月。贮存前，每个贮存管必须用合适的盖子密封。检测前，样品必须恢复至室温并充分混匀。

【洗涤液配制】

使用前，浓缩的洗涤液应恢复至室温，出现结晶可放于水浴加速溶解，然后用蒸馏水或去离子水作 10 倍稀释（例如：每板用 50 ml 浓缩液加上 450ml 水），即 1×洗液。

【操作步骤】

使用前所有试剂应恢复至室温（22±5°C），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（可参考下表）。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	-	7P	7A	7B	15P	15A	15B	23P	23A	23B
B	+	+	+	8P	8A	8B	16P	16A	16B	24P	24A	24B
C	1P	1A	1B	9P	9A	9B	17P	17A	17B	25P	25A	25B
D	2P	2A	2B	10P	10A	10B	18P	18A	18B	26P	26A	26B
E	3P	3A	3B	11P	11A	11B	19P	19A	19B	27P	27A	27B
F	4P	4A	4B	12P	12A	12B	20P	20A	20B	28P	28A	28B
G	5P	5A	5B	13P	13A	13B	21P	21A	21B	29P	29A	29B
H	6P	6A	6B	14P	14A	14B	22P	22A	22B	30P	30A	30B

注：数字 1-30 为动物检测编号，P 为 PBS 刺激样品，A 为 APPD 刺激样品，B 为 BPPD 刺激样品。

2. 每孔加入 1×洗液 50μl 后，分别在 A1、A2、A3 孔中加入阴性性对照（3 孔），B1、B2、B3 孔中加入阳性对照（3 孔），每孔 50μl，其余孔分别加入待检血浆（PBS 刺激血浆、APPD 刺激血浆、BPPD 刺激血浆），每孔 50μl，充分混匀后，贴上封板膜，置 37°C 孵育 60 分钟±5 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. 每孔加入酶结合物溶液 100μl，贴上封板膜，置 37°C 孵育 60 分钟±5 分钟；
5. 重复洗涤 5 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°C 避光显色 15 分钟；
7. 每孔加入终止液 50μl，轻轻振荡混匀，置酶标仪 450nm 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 阴性对照 OD₄₅₀ 均值应 < 0.200
- ② 阳性对照 OD₄₅₀ 均值应 > 0.500

2. 按一下方法判定结果：

- ① 阳性：BPPD 的 OD₄₅₀ - PBS 的 OD₄₅₀ ≥ 0.1，且 BPPD 的 OD₄₅₀ - APPD 的 OD₄₅₀ ≥ 0.1，即为阳性；
- ② 阴性：BPPD 的 OD₄₅₀ - PBS 的 OD₄₅₀ < 0.1，或 BPPD 的 OD₄₅₀ - PBS 的 OD₄₅₀ < 0.1，即为阴性。

温馨提醒：地塞米松治疗或分娩引起的免疫抑制可降低 r 干扰素对结核杆菌抗原的应答。1 周内注射地塞米松或 4 周内分娩的动物应重新检测，以排除假阴性结果。

【贮藏条件】 2-8°C 避光保存

【保存期】 该产品有效期 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