

牛布鲁氏杆菌病抗体ELISA 试剂盒使用说明书

【用途】

本试剂盒用于牛布鲁氏杆菌抗体的检测。

【原理】

本试剂盒抗原包被板是由牛种布鲁氏杆菌 99 菌株 (S99) 经纯化提取脂多糖抗原包被而成。如果待测样品中含有布鲁氏杆菌抗体, 则与包被的抗原结合, 加酶标结合物后, 形成抗原-抗体-酶标抗体复合物, 再加入显色液作用, 在酶标仪 405nm 波长测定各孔吸光度值, 并计算样品的 P%值, 判定结果。

【试剂盒组成】

名称	数量
抗原包被板 (充满保护液)	5 块 (5×96 孔)
1. 10 倍浓缩洗涤液	1 瓶 (400ml)
2. 样品稀释液	1 瓶 (180ml)
3. 阴性对照	1 支 (0.3ml)
4. 阳性对照	1支 (0.3ml)
5. 酶结合物浓缩液	1 瓶 (0.8ml)
6. ABTS 浓缩液	1 瓶 (1.6ml)
7. ABTS 稀释液	1 瓶 (65ml)
8. 终止液	1 瓶 (65ml)
10. 一次性封板膜	10 张
11. 自封袋	1 个
12. 说明书	1 份

【其它需自备的物品】

1. 10μl 至1000μl 的可调或固定量程移液器, 100μl 八道或十二道微量移液器;
2. 一次性移液器吸头;
3. 稀释用96 孔板;
4. 30%H₂O₂ 溶液;
5. 酶标仪 (含405nm 波长滤光片);
6. 蒸馏水或去离子水;
7. 自动或手动洗板系统;
8. 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1小时后再使用，但是不要超过3小时；未用完的抗原包被板保持孔内保护液，置2~8℃避光保存；
2. 待检血清样品应在56℃水浴灭活30 分钟，吸取每个血清样品后都要更换吸头；
3. 加液时均应使用移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，应使用八道或十二道微量移液器，从稀释板转移到抗原包被板中，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5分钟内完成；
8. 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，更不要使用过期试剂；
10. 加终止液容易产生气泡，加液时避免孔内产生气泡，因气泡会使其吸光度值比正常值高；
11. 若浓缩洗涤液、样品稀释液、ABTS浓缩液、ABTS稀释液和终止液中有结晶盐析出，可在20~30℃水浴加热溶解；
12. 注意避免试剂与眼、鼻及皮肤接触；
13. 请严格按照使用说明书操作步骤操作；
14. 本试剂盒只用于实验室检测。

【样品制备】

按常规方法制备血清，要求样品清亮，无溶血、腐败。在稀释板中按1:50 的体积比稀释待检血清（490μl 样品稀释液中加入10μl 待检血清）。注意：阴性对照和阳性对照也需要同样稀释。

【洗涤工作液的配制】

使用前，10倍浓缩洗涤液应恢复至室温（25℃左右），摇动使析出的盐溶解（必要时可20~30 ℃水浴加热溶解），然后用蒸馏水或去离子水作10倍稀释（例如：将30 ml 10倍浓缩洗涤液加到270ml水）。洗涤工作液应该在2~8℃避光保存，三天内用完。

【3%H₂O₂溶液的配制】

30%H₂O₂溶液用蒸馏水或去离子水作10倍稀释。3%H₂O₂溶液需在2~8℃避光保存，在8小时内使用。

【酶结合物工作液的配制】

在使用酶结合物工作液前15 分钟内，将酶结合物浓缩液用洗涤工作液作100 倍稀释（例如：将0.1ml 酶结合物浓缩液加到9.9ml 洗涤工作液中）。

【ABTS 工作液的配制】

在使用ABTS工作液前15分钟内，将ABTS浓缩液用ABTS稀释液作40倍稀释（例如：将0.5ml ABTS浓缩液加到19.5ml ABTS稀释液中），并按照1/100比例加入3% H₂O₂溶液（例如：10ml ABTS工作液中加入3% H₂O₂工作液0.1ml），混匀。

【操作步骤】

使用前所有试剂应恢复至室温（25℃），试剂应轻轻旋转或振荡混匀。

1. 取出抗原包被板（根据样品多少，可拆开分次使用），弃去微孔板里的保护液，然后在吸水纸上将板内液体完全拍净。注意：不要让板孔干燥或擦拭板孔。剩余的抗原包被板不要弃去板孔中的保护液；
2. 将已稀释好的血清样品各取100μl 加入到抗原包被板的S1-S92, 如图所示。然后，分别取阴性对照、阳性对照加入到NC 孔和PC 孔；
3. 充分混匀后，贴上封板膜，在室温（20～30 ℃）下孵育30 分钟；
4. 小心揭掉封板膜，弃去各孔中液体、拍净。每孔加300μl 洗涤液，重复洗涤3 次，最后在吸水纸上拍净；注意：不要让板孔干燥或擦板孔；
5. 每孔加入酶结合物液100μl，贴上封板膜，在室温（20～30 ℃）下孵育30 分钟；
6. 重复步骤4；
7. 每孔加入稀释好的ABTS 工作液100μl，轻轻振荡混匀，室温避光静置10分钟；
8. 每孔加入终止液100μl，轻轻振荡混匀，避免产生气泡。置酶标仪405nm 波长处测定各孔OD405 值，在5 分钟内完成。

【结果判定】

PC: 阳性对照平均吸光度值。NC: 阴性对照平均吸光度值。S: 样品吸光度值。

1. 试验结果同时符合下列条件，方为有效：

- ① 阴性对照值：NC<0.2；
- ② 阳性对照值：0.80< PC<2.50；

2. 按以下计算方法的判定结果：

$$P\%值 = (S - NC) \times 100 / (PC - NC)$$

- 1 阳性：P%值>30%，即抗体阳性。

- 2 阴性：P%值<30%，即抗体阴性。

【贮藏条件】 2～8℃避光保存

【保存期】 该产品有效期18 个月

图：包被板上加样示例图

图a. 少于12个样品			图b. 13 ~92个样品							
A	PC	NC	A	PC	NC	S13	S21	- - -	S77	S85
B	PC	NC	B	PC	NC	S14	S22	- - -	S78	S86
C	S1	S7	C	S1	S7	S15	S23	- - -	S79	S87
D	S2	S8	D	S2	S8	S16	S24	- - -	S80	S88
E	S3	S9	E	S3	S9	S17	S25	- - -	S81	S89
F	S4	S10	F	S4	S10	S18	S26	- - -	S82	S90
G	S5	S11	G	S5	S11	S19	S27	- - -	S83	S91
H	S6	S12	H	S6	S12	S20	S28	- - -	S84	S92

图c. 93个样品及以上需另取一块抗原包被板，阴性对照和阳性对照的设置如图b。
NC：阴性对照孔，PC：阳性对照孔，S1-S92：血清样品孔。