

猪瘟病毒抗体ELISA 检测试剂盒使用说明书

【用途】

本试剂盒用于检测猪血清中猪瘟病毒抗体。既可进行猪瘟疫苗免疫状况评估，又可用于感染猪的血清学诊断。

【原理】

本试剂盒采用基因工程表达的猪瘟病毒抗原包被微量反应板，利用间接ELISA 原理进行检测。如果待测样品中含有猪瘟病毒抗体，则与包被抗原结合，加入辣根过氧化物酶标记的兔抗猪抗体后，形成抗原-抗体-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，判定结果。

【试剂盒组成】

名称数量

1. CSFV 抗原包被板1 块（8×12 孔）
2. 20 倍浓缩洗涤液1 瓶（30mL）
3. CSFV 阴性对照1 支（1.2mL）
4. CSFV 阳性对照1 支（1.2mL）
5. CSFV 样品稀释液1 瓶（15mL）
6. CSFV 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 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℃避光孵育箱；
5. 1000mL 量筒（配制洗涤液用）；
6. 酶标仪（含450nm 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30 分钟后再使用；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，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。

【样品制备】

按常规方法制备血清，要求血清清亮，无溶血、腐败。

【洗涤液配制】

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20 倍稀释（例如：每板用30 ml 浓缩液加上570ml 水）。

【样品稀释】

在稀释板中按1:10 的体积比稀释待检血清（135 μ l 样品稀释液中加入15 μ l 待检血清）。

注意：阴性和阳性对照无需稀释。

【操作步骤】

使用前所有试剂应恢复至室温（25 $^{\circ}$ C），试剂应轻轻旋转或振荡混匀。

1. 取出抗原反应板（根据样品多少，可拆开分次使用），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）原液（不用稀释）、稀释好的待检猪血清各100 μ l。充分混匀后，贴上封板膜，置37 $^{\circ}$ C 孵育1 小时；
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100 μ l，贴上封板膜，置37 $^{\circ}$ C 孵育30 分钟；
5. 重复步骤3；
6. 每孔加入底物液A50 μ l，再加入底物液B 50 μ l，轻轻振荡混匀，置37 $^{\circ}$ C 避光显色10 分钟；
7. 每孔加入终止液50 μ l，轻轻振荡混匀，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 两孔阴性对照OD₄₅₀ 平均值应 \leq 0.25；
- ② 每孔阳性对照OD₄₅₀ 平均值均 \geq 0.75；

2. 按以下计算方法的判定结果：

- 1 阳性：样品OD₄₅₀值 $>$ 阳性对照OD₄₅₀ 平均值 \times 0.3，即CSFV 抗体阳性。
- 2 可疑：阳性对照OD₄₅₀ 平均值 \times 0.25 \leq 样品OD₄₅₀值 \leq 阳性对照OD₄₅₀ 平均值 \times 0.3 ，应再进行双孔复试，若任意一孔或两孔均为阳性，则视为CSFV 抗体阳性；若两孔均为阴性则视为CSFV 抗体阴性。
- 3 阴性：样品OD₄₅₀值 $<$ 阳性对照OD₄₅₀ 平均值 \times 0.25，即CSFV 抗体阴性。

【贮藏条件】2-8 $^{\circ}$ C 避光保存

【保存期】该产品有效期 1 年