

猪圆环病毒 II 型抗体酶免检测试剂盒说明书

用途

猪圆环病毒 II 型 (PCV-2) 抗体检测, 用于猪圆环病毒 II 型感染的诊断与监测。

原理

猪圆环病毒 (Porcine circovirus virus PCV) 属于圆环病毒科圆环病毒属、根据猪圆环病毒的致命性以及基因组差异可分为无致命性的猪圆环病毒 I 型 (PCV-1) 和有致命性的猪圆环病毒 II 型 (PCV-2)。PCV-2 是引发猪断奶后多系统衰弱综合征 (Post-weaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) 的主要病原, 该病主要以患畜生长迟缓, 进行性消瘦和多系统病理损伤为特征, 除了引发 PMWS 外, PCV-2 还与猪皮炎与肾病综合征, 新生仔猪先天性脑震颤, 增生性坏死肺炎怀孕母猪的繁殖障碍等病的发生有关, 它已给世界养殖业造成了巨大的经济损失

本试剂盒首次创造利用 PCV-2 合成肽抗原建立间接 ELISA 方法检测猪血清中的 PCV-2 特异性 IgG 抗体。在聚苯乙烯微孔酶标板上, 包被 PCV-2 合成肽抗原, 该多肽是 PCV-2 ORF2 基因编码的具有高度抗原性和特异性的抗原表位, 待检血清中的 PCV-2 抗体和包被抗原结合, 加入 HRP 标记的兔抗猪 IgG 抗体后, 形成抗原-抗体-酶标抗体复合物, 再加入 TMB 底物作用显色, 在酶标仪 450nm 处测定各孔 OD 值, 判定结果。

试剂盒组成

名称	数量
PCV-2 抗原包被板	1 块 (8×12 孔)
20 倍浓缩洗涤液	1 瓶 (30ml)
PCV-2 阴性对照	1 支 (1.2ml)
PCV-2 阳性对照	1 支 (1.2ml)
PCV-2 样品稀释液	1 瓶 (15ml)
PCV-2 酶结合物液	1 瓶 (12ml)
底物液 A	1 瓶 (8ml)
底物液 B	1 瓶 (8ml)
终止液	1 瓶 (8ml)

一次性封板膜	2 张
自封袋（干燥剂）	1 个
说明书	1 份

其他需自备的物品

50ul 和 100ul 的精确微量移液器，200ul 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℃避光孵育箱

1000ml 量筒（配制洗涤液用）

酶标仪（含 450nm 波长滤光片）

蒸馏水或者去离子水

自动或手动洗板系统

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（约 30 分钟），未使用完的抗原包被板加干燥剂放于自封袋中密封，置 2-8 度中保存
- 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 洗涤时各孔均需要加满洗涤液，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均灭活处理
- 9 不同批次试剂不能混用
- 10 底物 B 液中含有 TMB 成分，对强光和氧化剂敏感，应尽量避免光
- 11 终止液为 2M H_2SO_4 ，应避免与眼，皮肤接触

12 请严格按照实验操作步骤操作

样品准备

取猪全血，按照常规方法制备血清，要求血清量，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，然后再用蒸馏水或者去离子水作 20 倍稀释（例如：每板用 30 浓缩液加上 570ml 水）

样品稀释

在稀释板上按 1:5 的体积比稀释待检血清（120 μ l 样品稀释液+30 μ l 待检血清）

注意：阴性和阳性对照无须稀释。

操作步骤

使用前所有试剂应恢复室温（20℃-30℃），试剂应轻轻旋转或振荡混匀

- 1 取出抗原反应板，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），阴性对照（2 孔）原液（不同稀释），稀释好的待检猪血清各 100 μ l，充分混匀后，贴上封板膜，至 37℃ 孵 30 分钟
- 3 小心的揭掉封板膜，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 每孔加入酶标结合物液 100 μ l，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 50 μ l，再加入底物液 B 50 μ l，轻振混匀，置 37℃ 避光显色 15 分钟
- 7 每孔加入终止液 50 μ l，轻振混匀，置酶标仪 450nm 波长处测定各孔 OD₄₅₀ 值

结果判定

- 1 试验结果同时符合以下条件的，方为有效
两孔阴性对照 OD_{450nm} 平均值小于等于 0.15
每孔阳性对照 OD_{450nm} 值均大于 0.60

- 2 临界值=阳性对照孔 OD_{450nm} 均值 $\times$ 0.25

- 3 结果判定

被检样品 OD_{450nm} 值 $<$ 临界值，为 PCV-2 抗体阴性

样品 OD_{450nm} 值 $\geq$ 临界值，为初试 PCV-2 抗体阳性

初试阳性的样品应再进行双孔复试，若任意一孔或者两孔均为阳性，则视 PCV-2 为 PCV-2 抗体阳性，若两孔均为阴性则视为 PCV-2 抗体阴性

贮藏条件：保存试剂盒于 2-8℃

保存期：本产品有效期为 6 个月。