仅供科研使用，不得用于临床检验。

猪瘟病毒抗体定性检测试剂盒（ELISA）说明书

【产品名称】

通用名称：猪瘟病毒抗体定性检测试剂盒（ELISA）

英文名称：Test Kit for Antibodies to Classical Swine Fever Virus ELISA KIT

【包装规格】

96 人份/盒

【预期用途】

仅供科研使用，猪瘟是由猪瘟病毒（Classical Swine Fever Virus，CSFV）引起的猪的一种高度接触性、出血性和致死性传染病，其特征为高热稽留和微血管壁变性而引起的广泛出血、坏死、梗塞等，慢性以纤维素坏死性肠炎为特征。

本试剂用于检测猪血清中猪瘟病毒抗体，可用于猪瘟病毒疫苗免疫效果评价。

【检验原理】

本试剂盒系由预包被猪瘟病毒重组 E2 蛋白的酶标板、酶标记物及其他配套试剂组成，应用酶联免疫法（ELISA）原理检测猪血清、血浆样本中猪瘟病毒抗体。实验时在酶标板中加入对照血清和待检样本，经温育后若样品中含有猪瘟病毒抗体，则将与酶标板上抗原结合，经洗涤除去未结合的其他成分后；再加入酶标记物，与酶标板上抗原抗体复合物发生特异性结合；再经洗涤除去未结合的酶标记物，在孔中加 TMB 底物液，与酶反应形成蓝色产物，显色深浅与样品中的特异性抗体含量成正相关；加入终止液终止反应后，产物变为黄色；用酶标仪在 450nm 波长测定各反应孔中的吸光值，即可知样品是否含有猪瘟病毒抗体。

【主要组成成分】主要成分

组分	数量	主要成分
阴性对照	1.0 ml*1	--
阳性对照	1.0 ml*1	--
包被微孔板	96T*1	预包被固相抗体
HRP 标记抗体	22mL*1	HRP 标记的检测抗体
样本稀释液	50mL*1	--
底物液 A	6mL*1	过氧化脲工作液
底物液 B	6mL*1	TMB 工作液
终止液	6mL*1	--
20×浓缩洗涤液	40mL*1	含 0.15%Tween20 的 PBS
说明书	1 份	--
自封袋	1 个	--
不干胶	2 片	--

需要但未提供的材料及耗材

1、酶标仪（450nM）

2、精密移液器及一次性吸头

3、蒸馏水

4、洗瓶或者自动洗板机 5、37℃水浴锅或恒温箱

6、500ml 量筒

7、无粉一次性乳胶手套

【储存条件及有效期】

1、2-8℃保存，切勿冷冻，有效期 6 个月。

2、 开封使用后，包被微孔板放入带有干燥剂的自封袋中，密闭自封袋，并将全部试剂放回

2-8℃冰箱。

3、 开封后，按照建议的条件保存，校准品、包被微孔板和 HRP 标记抗体，有效期为 14 天，其他成分在标签标明的有效期内是稳定的。

【适用仪器】

半自动的酶标仪，如 Thermo MK3，或者国产酶标仪。

【样本要求】

样本类型和采集以下只是列出样品采集的一般指南。所有样本采集过程中，不得使用叠氮钠做为防腐剂。

1、 细胞培养上清：4000rpm 条件下离心 20min，去除细胞颗粒和聚合物，上清液保存在-20℃以下，避免反复冻融。

2、 血清：使用不含热原和内毒素的试管，操作过程中避免任何细胞刺激，4000rpm 条件下离心 20min，小心地分离出血清，保存在- 20℃以下，避免反复冻融。

3、 血浆：肝素，EDTA，或柠檬酸钠作为抗凝剂。在 4000rpm 条件下，离心 20 分钟取上清，血浆保存在-20℃以下，避免反复冻融。

样本保存和稳定性

样本在 2-8℃条件下，可以储存 72h，或者在- 20℃储存 6 个月。样本收集后，不是一次检测完，请按一次用量分装冻存，避免反复冻融，使用时在室温下解冻，确保样品均匀充分解冻。

【样品准备】

1.取动物全血按常规方法制备血清，要求血清清亮，无溶血、无污染。样品 1 周内可于 2～8℃保存，长期需置-20℃保存。

2.用样品稀释液将待检血清按 40 倍稀释（如 5μl 血清加入 195μl 样品稀释液中，混匀）。阴、阳性对照不用稀释。

3.浓缩洗涤液使用前应恢复至室温使沉淀溶解，然后用蒸馏水或去离子水作 20 倍稀释。

【检验方法】

1.使用前将试剂盒置室温 30 分钟，恢复至室温。

2.取所需用量酶标板条，设空白对照 1 孔、阴性/阳性对照各 2 孔，未用的板条尽快密封，2～8℃保存。

3.空白对照孔加样品稀释液 100μl；阴、阳性对照孔分别加入阴、阳性对照 100μl；样品孔每孔加入稀释后的样品 100μl。

4.混匀，置 37℃反应 30 分钟。

5.扣去孔内液体，每孔加满洗涤液，静置 30 秒后弃去，重复洗涤 5 次，拍干。

6.每孔加酶标记物 100μl（空白孔除外）。置 37℃反应 30 分钟。

7.洗涤，同步骤 5。

8.每孔依次加底物液 A、底物液 B 各 50μl，混匀，37℃避光反应 10 分钟。

9.每孔加终止液 50μl，混匀，于 450nm(可用 630nm 作参比波长）测定各孔吸光值（A 值)，无参比波长用空白孔调零(即所有孔吸光值减去空白孔吸光值)。

【参考值】 实验正常的情况下，阴性对照≤0.30，阳性对照≥0.6。

【检验结果的解释】

1. 样本的 OD 值为 A；

2. 阙值计算：SP 值=（A-阴性对照）/(阳性对照-A)

SP 值≥0.2，结果为阳性;SP 值<0.2，结果为阴性。

2.本实验结果为阴性或可疑时表明猪只抗体水平不足，建议补打相应疫苗。

【试验方法的局限性】

该试验仅作为定性检测猪血清、血浆中猪瘟病毒抗体，根据 SP 值高低可作抗体水平强、中、弱的粗略评估。

【保存条件】

2℃-8℃保存，有效期 6 个月。

【注意事项】<u>生物安全</u>

1、 检测必须符合实验室管理规范的规定，严格防止交叉污染，所有样品、洗弃液和各种废弃物都应按照传染物进行处置。

2、 试剂盒的液体组分中，含有 proclin-300 防腐剂，可能引起皮肤过敏反应，避免吸入烟雾与皮肤接触。

3、 底物液对皮肤、眼睛和上呼吸道有刺激作用，避免吸入烟雾。戴上防护手套，实验完成后彻底洗手。

<u>技术提示</u>

1、混合蛋白溶液时，避免起泡。

2、加校准品与样本时，每个校准品浓度和样本都要更换移液枪头，公共组分应该悬臂加样，避免交叉污染。

3、合适的温育时间，和充分的洗涤步骤，是保证实验结果准确性的必要条件。

4、底物溶液为无色液体，保存过程中变为蓝色，代表底物溶液已经失效，不得使用。5、终止液加样顺序与底物溶液加样顺序一致，加入终止液后，蓝色底物产物，会瞬间变为黄色。

6、 实验中，用剩的板条，应立即放回自封袋中，密封（低温干燥）保存。

7、 所有液体组分，使用前充分摇匀，严格按照说明书标明的时间、加样量及加样顺序进行温育操作。废物处理

所有使用或未使用的试剂，所有污染性的一次性材料，应当遵循传染性或潜在传染性产品的处理程序，每个实验室都有责任根据其实验的类型和危险性级别，进行废物和污物的处理，同时要严格依照有关规定对待所有的废物和污物。