

仅供科研使用，不得用于临床检验。

猪伪狂犬病毒 gD 抗体定性检测试剂盒（ELISA）说明书

【产品名称】

通用名称：猪伪狂犬病毒 gD 抗体定性检测试剂盒（ELISA）

英文名称：Test Kit for Antibodies to Porcine Pseudorabies Virus gD ELISA KIT

【包装规格】

96 人份/盒

【预期用途】

仅供科研使用，伪狂犬病又名奥耶斯基氏病（Aujeszky's disease），是由伪狂犬病毒（Pseudorabies Virus, PRV）引起的家畜和多种野生动物的一种以发热、奇痒、呼吸和神经系统疾病为特征的急性传染病。

本试剂用于检测猪血清中猪伪狂犬病毒 gD 抗体，可用于猪伪狂犬病毒疫苗免疫效果评价。

【检验原理】

本试剂盒系由预包被猪伪狂犬病毒重组 gD 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、血浆样本中猪伪狂犬病毒 gD 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伪狂犬病毒 gD 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伪狂犬病毒 gD 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	预包被固相抗体
HRP 标记抗体	6mL	HRP 标记的检测抗体
样本稀释液	50mL	
底物液 A	6mL	过氧化脲工作液
底物液 B	6mL	TMB 工作液
终止液	6mL	
20×浓缩洗涤液	30mL	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
- 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，仅供科研使用，不得用于临床诊断。

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。

备注：血清血浆样本需要按照 40 倍稀释（如 5ul 血清/血浆加入 195ul 样本稀释液中，混匀）。阴阳性对照不用稀释。

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。

【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 100 μl；阴、阳性对照孔分别加入阴、阳性对照 100 μl；样品孔每孔加入稀释后的样品 100 μl。

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 100 μl（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 50 μl，混匀，37℃避光反应 10 分钟。

仅供科研使用，不得用于临床诊断。

9. 每孔加终止液 50 μ l, 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 \leq 0.30, 阳性对照 \geq 0.6。

【检验结果的解释】

1. 阈值计算: $SP \text{ 值} = (\text{OD 样本} - \text{OD 阴性对照}) / (\text{OD 阳性对照} - \text{OD 阴性对照})$

SP 值 \geq 0.2, 结果判定为阳性; SP 值 $<$ 0.2, 结果判定为阴性。

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、血浆中猪伪狂犬病毒 gD 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 $^{\circ}$ C-8 $^{\circ}$ C 保存, 有效期 6 个月。

【注意事项】

生物安全

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。

技术提示

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。
仅供科研使用, 不得用于临床诊断。

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。