

猪口蹄疫病毒（FMDV）酶联免疫分析（ELISA）

试剂盒使用说明书

本试剂仅供研究使用 目的：本试剂盒用于测定猪血清，血浆及相关液体样本中口蹄疫病毒（FMDV）水平。

实验原理：

本试剂盒采用双抗体夹心酶联免疫法（ELISA）测定标本中猪口蹄疫病毒（FMDV）水平。用纯化的猪口蹄疫病毒（FMDV）抗体包被微孔板，制成固相抗体，可与样品中猪口蹄疫病毒（FMDV）相结合，经洗涤除去未结合的抗原和其他成分后再与 HRP 标记的口蹄疫病毒（FMDV）抗体结合，形成抗体-抗原-酶标抗体复合物，经过彻底洗涤后加底物 TMB 显色。TMB 在 HRP 酶的催化下转化成蓝色，并在酸的作用下转化成最终的黄色。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度(OD 值),与 CUTOFF 值相比较,从而判定标本中猪口蹄疫病毒(FMDV)的存在与否。

试剂盒组成：

试剂盒组成	48 孔配置	96 孔配置	保存
说明书	1 份	1 份	
封板膜	2 片 (48)	2 片 (96)	
密封袋	1 个	1 个	
酶标包被板	1×48	1×96	2-8℃保存
阴性对照	0.5ml×1 瓶	0.5ml×1 瓶	2-8℃保存
阳性对照	0.5ml×1 瓶	0.5ml×1 瓶	2-8℃保存
酶标试剂	3 ml×1 瓶	6 ml×1 瓶	2-8℃保存
样品稀释液	3 ml×1 瓶	6 ml×1 瓶	2-8℃保存
显色剂 A 液	3 ml×1 瓶	6 ml×1 瓶	2-8℃保存
显色剂 B 液	3 ml×1 瓶	6 ml×1 瓶	2-8℃保存
终止液	3ml×1 瓶	6ml×1 瓶	2-8℃保存
浓缩洗涤液	(20ml×20 倍) ×1 瓶	(20ml×30 倍) ×1 瓶	2-8℃保存

样本处理及要求：

1. 血清：室温血液自然凝固 10-20 分钟，离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分）。仔细收集上清，保存过程中如出现沉淀，应再次离心。
2. 血浆：应根据标本的要求选择 EDTA 或柠檬酸钠作为抗凝剂，混合 10-20 分钟后，离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分）。仔细收集上清，保存过程中如有沉淀形成，应该再次离心。
3. 尿液：用无菌管收集，离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分）。仔细收集上清，保存过程中如有沉淀形成，应再次离心。胸腹水、脑脊液参照实行。
4. 细胞培养上清：检测分泌性的成份时，用无菌管收集。离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分）。仔细收集上清。检测细胞内的成份时，用 PBS (PH7.2-7.4) 稀释细胞悬液，细胞浓度达到 100 万/ml 左右。通过反复冻融，以使细胞破坏并放出细胞内成份。离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分）。仔细收集上清。保存过程中如有沉淀形成，应再次离心。
5. 组织标本：切割标本后，称取重量。加入一定量的 PBS, PH7.4。用液氮迅速冷冻保存备用。标本融化后仍然保持 2-8℃ 的温度。加入一定量的 PBS (PH7.4)，用手工或匀浆器将标本匀浆充分。离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分）。仔细收集上清。分装后一份待检测，其余冷冻备用。
6. 标本采集后尽早进行提取，提取按相关文献进行，提取后应尽快进行实验。若不能马上进行试验，可将标本放于 -20℃ 保存，但应避免反复冻融。
7. 不能检测含 NaN₃ 的样品，因 NaN₃ 抑制辣根过氧化物酶的（HRP）活性。

操作步骤：

1. 编号：将样品对应微孔按序编号，每板应设阴性对照 2 孔、阳性对照 2 孔、空白对照 1 孔（空白对照孔不加样品及酶标试剂，其余各步操作相同）
2. 加样：分别在阴、阳性对照孔中加入阴性对照、阳性对照 50 μ l。然后在待测样品孔先加样品稀释液 40 μ l，然后再加待测样品 10 μ l。加样将样品加于酶标板孔底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀，
3. 温育：用封板膜封板后置 37℃ 温育 30 分钟。
4. 配液：将 30（48T 的 20 倍）倍浓缩洗涤液加蒸馏水至 600ml 后备用
5. 洗涤：小心揭掉封板膜，弃去液体，甩干，每孔加满洗涤液，静置 30 秒后弃去，如此重复 5 次，拍干。

6. 加酶：每孔加入酶标试剂 50 μ l，空白孔除外。
7. 温育：操作同 3。
8. 洗涤：操作同 5。
9. 显色：每孔先加入显色剂 A 50 μ l，再加入显色剂 B 50 μ l，轻轻震荡混匀，37 $^{\circ}$ C 避光显色 15 分钟
10. 终止：每孔加终止液 50 μ l，终止反应（此时蓝色立转黄色）。
11. 测定：以空白空调零，450nm 波长依序测量各孔的吸光度（OD 值）。测定应在加终止液后 15 分钟以内进行。

结果判定：

试验有效性：阳性对照孔平均值 \geq 1.00；阴性对照平均值 \leq 0.10

临界值（CUT OFF）计算：临界值=阴性对照孔平均值+0.15

阴性判定：样品 OD 值 < 临界值（CUT OFF）者为猪口蹄疫病毒（FMDV）阴性

阳性判定：样品 OD 值 \geq 临界值（CUT OFF）者为猪口蹄疫病毒（FMDV）阳性

注意事项

1. 操作严格按照说明书进行，本试剂不同批号组分不得混用。
2. 试剂盒从冷藏环境中取出应在室温平衡 15-30 分钟后方可使用，酶标包被板开封后如未用完，板条应装入密封袋中保存。
3. 浓洗涤液可能会有结晶析出，稀释时可在水浴中加温助溶，洗涤时不影响结果。
4. 封板膜只限一次性使用，以避免交叉污染。
5. 底物请避光保存。
6. 试验结果判定必须以酶标仪读数为准，使用双波长检测时，参考波长为 630nm
7. 所有样品，洗涤液和各种废弃物都应按传染物处理。终止液为 2M 的硫酸，使用时必须注意安全。

保存条件及有效期

1. 试剂盒保存：2-8 $^{\circ}$ C。
2. 有效期：6 个月