

仅供科研使用,不得用于临床检验。

猪乙脑病毒抗体(EPBV-Ab)检测试剂盒(ELISA)说明书

【产品名称】

通用名称：猪乙脑病毒抗体（EPBV-Ab）检测试剂盒（ELISA）

英文名称：Test Kit for Antibodies to Porcine Japanese Encephalitis Virus
(ELISA)

【包装规格】

96人份/盒

【预期用途】

仅供科研使用，猪乙型脑炎又名日本乙型脑炎是由猪乙脑病毒（Porcine Japanese Encephalitis Virus, JEV）引起的一种蚊媒性、急性人畜共患传染病，病猪主要表现为妊娠母猪流产、产死胎，公猪睾丸肿。

本试剂用于检测猪血清中猪乙脑病毒抗体，可用于猪乙脑病毒疫苗免疫效果评价。

【检验原理】

本试剂盒由预包被猪乙型脑炎病毒重组 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、血浆样本中猪乙型脑炎病毒抗体。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乙型脑炎病毒抗体，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，与酶标结合物反应形成蓝色产物，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乙型脑炎病毒抗体。

【主要组成成分】

主要成分

组分	数量	数量	主要成分
阴性对照	1.0 ml×1	1.5 ml×1	
阳性对照	1.0 ml×1	1.5 ml×1	
包被微孔板	96T	96T*2	预包被固相抗体
HRP 标记抗体	11mL	11mL*2	HRP 标记的检测抗体
样本稀释液	50mL	50mL	
底物液 A	6mL	11mL	过氧化脲工作液
底物液 B	6mL	11mL	TMB 工作液
终止液	6mL	11mL	2mol/L 稀硫酸
20×浓缩洗涤液	40mL	40mL	含 0.15%Tween20 的 PBS
说明书	1 份	1 份	--
自封袋	1 个	1 个	--
不干胶	2 片	4 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，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 5 μl 血清加入 195 μl 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 倍稀释成工作洗涤液（如 19 份蒸馏水或去离子水+1 份浓缩洗涤液）。

【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，盖好盖板膜，置 37℃（推荐水浴）避光反应 30 分钟。

5. 甩去孔内液体，每孔加 350 μl 工作洗涤液，静置 30 秒后弃去，重复洗涤 5 次，最后一次拍干。

6. 每孔加酶标记物 100 μl（空白孔除外）。盖好盖板膜，置 37℃ 避光反应 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，盖好盖板膜，置 37℃ 避光反应 10 分钟。

9. 每孔加终止液 50 μl，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 ≤ 0.10，阳性对照 ≥ 0.6。

仅供科研使用，不得用于临床诊断。

【检验结果的解释】

1. 样品 A 值 \geq 0.38 为阳性；样品 A 值在 0.2 到 0.38 之间为可疑；样品 A 值 $<$ 0.2 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、血浆中猪乙型脑炎病毒抗体，根据 A 值高低可作抗体水平强、中、弱的粗略评估。

【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。
- 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，仅供科研使用，不得用于临床诊断。

同时要严格依照有关规定对待所有的废物和污物。