



动物检验检疫技术

专业教学资源库

ELISA检测技术



ELISA

酶联免疫吸附试验: **E**nzyme **L**inked
Immuno**S**orbent **A**ssay



猪瘟抗体ELISA检测

科前动物生物制品责任有限公司产试剂盒



原理

【原理】 用间接ELISA检测猪血清中抗猪瘟病毒抗体。

- 猪瘟抗原包被微孔板
- 加入稀释的对照血清和待检血清，温育，洗涤；
若样品中含有抗猪瘟病毒的特异性抗体，则将与检测板上抗原结合，洗涤可除去未结合的抗体和其他成分；
- 加入酶标二抗，与检测板上抗原抗体复合物发生特异性结合，温育洗涤；除去未结合的酶结合物；
- 加TMB底物液，与酶反应形成蓝色产物；
- 加HF溶液终止反应；
- 用酶标仪630nm波长测定各反应孔中的OD值。
- 适用于猪场猪瘟疫苗免疫状况的评价以及感染猪的血清学诊断。



【试剂盒主要成分】

- 96孔抗原包被板、阴性对照血清（蓝色盖）1管（0.5ml/管）、阳性对照血清（红色盖）、羊抗猪酶标二抗（蓝色盖）、20倍浓缩洗涤液（白色盖）、底物液A（红色盖）、底物液B（黑色盖）、终止液（蓝色盖）、样品稀释液（黄色盖）、96孔血清稀释板



【样品制备】

- 取动物全血，按常规方法制备血清，要求血清清亮，无溶血。



【洗涤液配制】

- 使用前，浓缩的洗涤液应恢复至室温（ 25°C 左右），并摇动使沉淀的盐溶解（最好在 37°C 水中加热5-10分钟），然后用蒸馏水或去离子水作20倍稀释（例如：每板用20 ml浓缩液加上380ml水），稀释好的洗涤液在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 可以存放7天。



【样品和对照稀释】

- 样品稀释：1:40的体积稀释待检血清样品（195 μ l样品稀释液中加5 μ l待检血清样品）。
- 对照稀释：在血清稀释板中按1:40分别稀释阳性对照和阴性对照（234 μ l样品稀释液中加6 μ l对照血清）。



【注意事项】

1. 试剂盒使用前各试剂应平衡至室温，使用后放回2-8°C。
2. 不同批号试剂盒的试剂组分不得混用，使用试剂时应防止试剂污染。
3. 底物液B不要暴露于强光，避免接触氧化剂。
4. 未使用的抗原包被板切记不要撕开上面的封口膜。
5. 待检血清样品数量较多时，应先使用血清稀释板稀释完所有样品，再转移到检测板，使反应时间一致。
6. 浓缩洗涤液用蒸馏水或去离子水稀释，如果发现结晶加热使其溶解后再使用。
8. 严格按照操作说明书可以获得最好的结果。
9. 2-8°C避光保存，有效10个月。



【操作步骤】

1. 取抗原包被板（根据样品多少，可拆开分次使用），分别将稀释好的待检血清和对照各取 $100\mu\text{l}$ 加入到抗原包被板孔中，每个待检样品1孔，阴性对照和阳性对照各设2孔，每孔 $100\mu\text{l}$ 。轻轻振匀孔中样品（勿溢出），置 37°C 温育30分钟。
2. 甩掉板孔中的溶液，每孔加入稀释好的洗涤液 $200\mu\text{l}$ ，静置3分钟倒掉，再在吸水纸上拍干，共计洗涤5次。
3. 每孔加羊抗猪酶标二抗 $100\mu\text{l}$ ，置 37°C 温育30分钟。
4. 洗涤5次, 方法同2。切记每次在干净吸水纸上拍干。
5. 每孔先加底物液A一滴（ $50\mu\text{l}$ ）、再加底物液B一滴（ $50\mu\text{l}$ ），混匀，室温(18°C - 25°C)避光显色10分钟。
- 6 每孔加终止液一滴($50\mu\text{l}$)，10分钟内测定结果（测定前在震荡器上轻轻震动一下）。

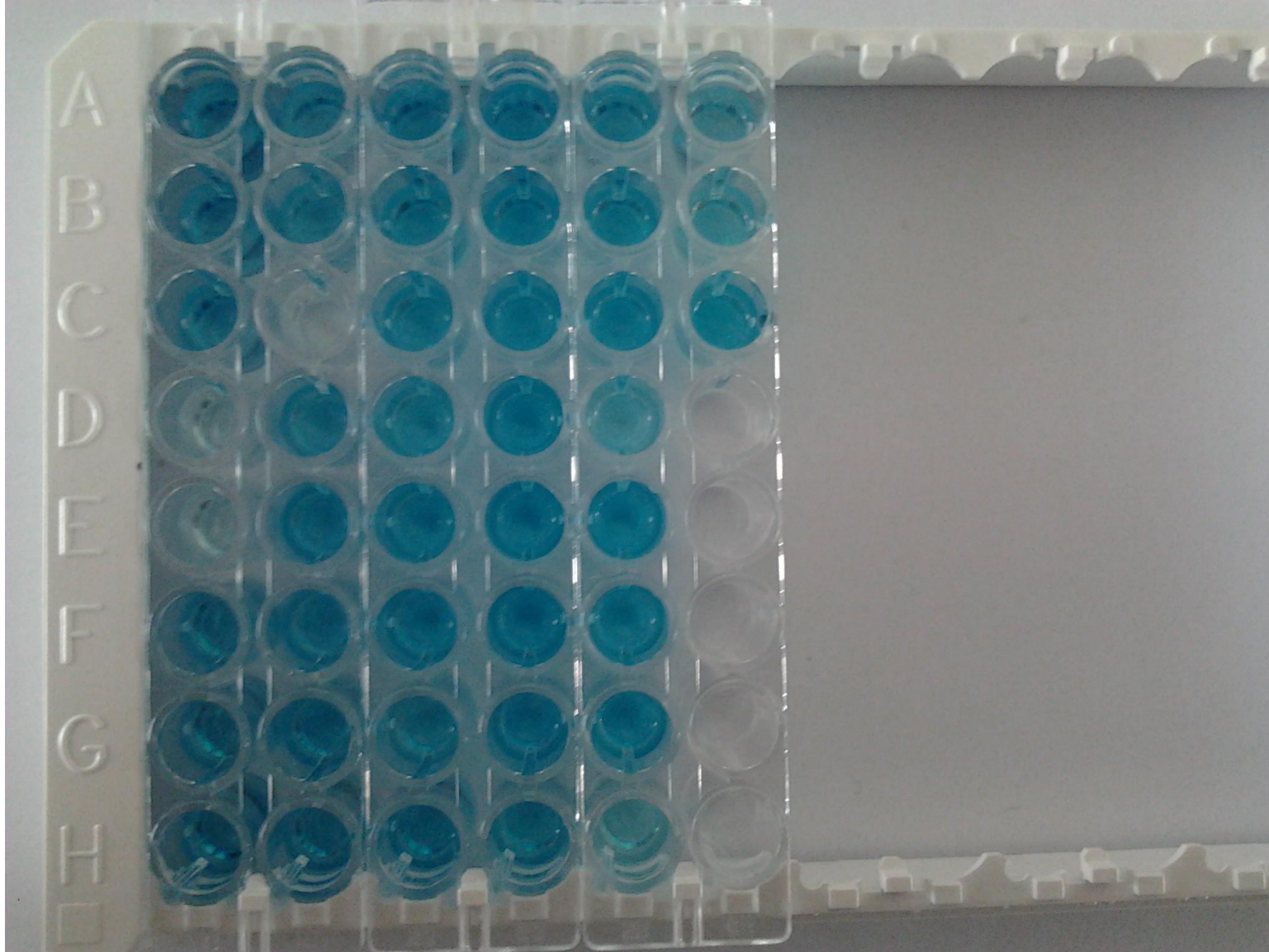


【结果判定】

- 在酶标仪上测各孔OD630值。试验成立的条件是阳性对照孔平均OD630nm值 ≥ 0.6 ，阴性对照孔平均OD630值必须 < 0.3 。
- 样品OD630值 > 0.35 ，判为阳性；样品OD630值 < 0.35 ，判为阴性。
- 注意：用620-650波长测定结果均有效。



ELISA结果





动物检验检疫技术

专业教学资源库

Thank You!