

## 口蹄疫 O 型液相阻断 ELISA 抗体检测试剂盒

### 使用说明书

#### 【产品名称】

通用名称：口蹄疫 O 型液相阻断 ELISA 抗体检测试剂盒

英文名称：Liquid-phase Blocking ELISA Kit for Detecting FMDV Type O Antibodies

【规格】96T×2 块

#### 【用途】

检测牛、羊等血清中的口蹄疫 O 型抗体，适用于动物疫苗免疫抗体监测。

【储藏与有效期】2~8℃保存，有效期 12 个月。

#### 【主要组份】

| 序号 | 组份名称           | 数量        |
|----|----------------|-----------|
| 1  | FMDV-O 抗原包被板   | 96T×2 块   |
| 2  | HRP-O 型 FMD 单抗 | 12mL×1 瓶  |
| 3  | 样品稀释液          | 20mL×1 瓶  |
| 4  | FMDV-O 阴性对照    | 1.0mL×1 管 |
| 5  | FMDV-O 阳性对照    | 1.0mL×1 管 |
| 6  | 单组份 TMB        | 12mL×1 瓶  |
| 7  | 终止液            | 12mL×1 瓶  |
| 8  | 浓缩洗涤液(20×)     | 20mL×1 瓶  |
| 9  | 说明书            | 1 份       |

#### 【试验操作】

##### 1、洗涤液配制

将浓缩洗涤液(20×)用蒸馏水或去离子水稀释成洗涤液(1×)，即 1 份浓缩洗涤液加入 19 份蒸馏水，配制的洗涤液(1×)作为洗板用。

##### 2、定性检测方案(单孔定性，每板检测 92 份血清样本)

#### 【操作步骤】

**2.1 加样:**设阴性对照血清(A1B1)和阳性血清(C1D1)各 2 孔，直接加入 50ul/孔对照血清；其它为被检样品孔，预先在相应孔内加入 45ul 的稀释液，接着加入 5ul/孔待检血清；最后，在所有孔内均加入 50ul 的 HRP-O 型 FMD 单抗，被检血清即为 1: 20 稀释。振荡，混匀，37℃温育 30 分钟。

**2.2TMB 底物:**用洗涤液洗板 3 遍，最后一次拍干，加入 TMB 底物，50ul/孔，37℃温育 15 分钟。

2.3 反应终止：加入终止液，50ul/孔，终止反应。

2.4 读值：酶标仪 450nm 波长读数。

### 【计算方法】

#### 2.5 阻断率计算

阴性对照平均值 =  $(OD_{-A1} + OD_{-B1}) / 2$ ;

阳性对照平均值 =  $(OD_{+C1} + OD_{+D1}) / 2$ ;

样品阻断率  $PI = [(阴性对照平均值 - 样品 OD 值) / 阴性对照平均值] \times 100\%$

根据以上公式计算被检样品和阳性对照样品的阻断率。

#### 2.6 试验成立

两孔阴性对照 OD450nm 值至少一孔 OD 值大于 0.5；两孔阳性对照至少一孔的阻断率大于 60%。

### 【结果判定】

被检样品  $PI \geq 50\%$  判为口蹄疫病毒 O 型抗体阳性； $PI < 50\%$  判为口蹄疫病毒 O 型抗体阴性。

### 3、定量检测方案(每板检测 10 或 20 份血清样本)

在使用前，所有的试剂盒组份应恢复到室温。试剂应轻轻旋转或振荡混匀。每个样品使用一个单独的吸头。

3.1 样品稀释：取出 FMD—O 抗原包被板，根据不同的需要，选择图 1 或图 2 中的一种布局进行操作。图 1 为可检测 10 份样品布局图；图 2 为可检测 20 份样品布局图。每次试验，每板均需设置阴阳性血清对照及 4 孔不加血清单抗对照。

以图 1 为例操作，A1~A10 每孔各加 75μL 的稀释液，其它所有孔内各加入 50μL 的稀释液。A1~A10 每孔各加 25μL 的待检样品，A11 孔加 50μL 的阳性对照，A12 孔加 50μL 的阴性对照，用排枪吹打混匀（每孔吹打 3~5 次），待检样品 A1~A10 分别以 50μL/孔的量从 A 到 H 连续 2 倍稀释；阳性对照 A11 以 50μL/孔的量从 A 到 H 连续 2 倍稀释；阴性对照 A12 以 50μL/孔的量从 A 到 B 连续 2 倍稀释。待检样品在第 1~10 列从 1:4 稀释至 1:512；阳性对照，从 1:2 稀释至 1:256，由于试剂盒提供的阳性对照已 1:4 稀释，则变为从 1:8 稀释至 1:1024；阴性对照，从 1:2 稀释至 1:4。

**3.2 加入 HRP—O 型 FMD 单抗：**样品稀释好后，在所有孔内加入 50ul 的 HRP—O 型 FMD 单抗，反应体系即为 100 $\mu$ L/孔。加样完毕后，所有稀释度翻倍，待检样品从 1:8~1:1024，阳性对照从 1:16~1:2048，阴性对照从 1:4~1:8，贴封板膜，振荡混匀。将加好样的 ELISA 反应板置于 37℃ 温育 30 分钟。

**3.3 洗板：**用 230 $\mu$ L ( $\pm$ 20 $\mu$ L) 洗涤液(1 $\times$ )洗涤板孔，共洗涤 3 次。每次洗涤后应弃去孔内的液体。在最后一次洗涤液弃去后，将孔中残留的洗涤液拍干。按 50 $\mu$ L/孔加入 TMB 底物，37℃ 避光温育 10~15min。**3.4 读值：**每孔再加 50 $\mu$ L 终止液终止反应，立即在 450nm 波长下读取 OD 值。

图 1 96 孔板检测 10 份样品布局图

|   | 1      | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10  | 11     | 12                   |
|---|--------|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|--------|----------------------|
| A | S1 1:8 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 | 1:16   | 1:4                  |
| B | 1:16   |    |    |    |    |    |    |    |    |     | 1:32   | 1:8                  |
| C | 1:32   |    |    |    |    |    |    |    |    |     | 1:64   | 空白                   |
| D | 1:64   |    |    |    |    |    |    |    |    |     | 1:128  | 空白                   |
| E | 1:128  |    |    |    |    |    |    |    |    |     | 1:256  | 不加<br>血清<br>单抗<br>对照 |
| F | 1:256  |    |    |    |    |    |    |    |    |     | 1:512  |                      |
| G | 1:512  |    |    |    |    |    |    |    |    |     | 1:1024 |                      |
| H | 1:1024 |    |    |    |    |    |    |    |    |     | 1:2048 |                      |

图 2 96 孔板检测 20 份样品布局图

|   | 1        | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  | 11     | 12                   |
|---|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------|----------------------|
| A | S1 1:16  | S2  | S3  | S4  | S5  | S6  | S7  | S8  | S9  | S10 | 1:16   | 1:4                  |
| B | 1:32     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 1:32   | 1:8                  |
| C | 1:64     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 1:64   | 空白                   |
| D | 1:128    |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 1:128  | 空白                   |
| E | S11 1:16 | S12 | S13 | S14 | S15 | S16 | S17 | S18 | S19 | S20 | 1:256  | 不加<br>血清<br>单抗<br>对照 |
| F | 1:32     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 1:512  |                      |
| G | 1:64     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 1:1024 |                      |
| H | 1:128    |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 1:2048 |                      |

## 【结果分析】

### 3.5 试验成立判断

不加血清单抗对照 OD 值应在  $2.0 \pm 1.5$  范围内；

阳性对照抗体效价不低于  $1:1024 \pm 1$  滴度；

阴性对照抗体效价应 $<1:8$ 。

### 3.6 结果判定

不加血清单抗对照 4 孔，弃去最高和最低 OD 值，计算剩余 2 孔的平均 OD 值，再除以 2，即得 50%对照值，该值即为临界值，表示阻断 50%反应的对照 OD 值。待检样品 OD 值 $>$ 临界值，判为阴性孔；待检样品 OD 值 $\leq$ 临界值，判为阳性孔。每份待检样品系列梯度稀释中，阳性孔的最高稀释倍数即为该待检样品的抗体效价。若临界值处于两个稀释孔 OD 值之间，抗体效价取相邻阳性孔和阴性孔稀释倍数的反对数中间值。如临界值处于 1:64（反对数值为 1.8）与 1:128（反对数值为 2.1）之间，则判定该份待检样品的抗体效价为 1:90（反对数值为 1.95）。

抗体效价 $\geq 64$ ，为疫苗免疫合格。

抗体效价计算对照表（反对数值）

| 抗体效价 | $\text{Log}_{10}(\text{效价})$<br>对照计算 | 抗体<br>效价 | $\text{Log}_{10}(\text{效价})$<br>对照计算 | 抗体<br>效价 | $\text{Log}_{10}(\text{效价})$<br>对照计算 |
|------|--------------------------------------|----------|--------------------------------------|----------|--------------------------------------|
| 1:4  | 0.6                                  | 1:32     | 1.5                                  | 1:256    | 2.4                                  |
| 1:6  | 0.75                                 | 1:45     | 1.65                                 | 1:360    | 2.55                                 |
| 1:8  | 0.9                                  | 1:64     | 1.8                                  | 1:512    | 2.7                                  |
| 1:11 | 1.05                                 | 1:90     | 1.95                                 | 1:720    | 2.85                                 |
| 1:16 | 1.2                                  | 1:128    | 2.1                                  | 1:1024   | 3                                    |
| 1:22 | 1.35                                 | 1:180    | 2.25                                 | 1:1440   | 3.15                                 |

### 4、注意事项

- 4.1 为使您的实验获得正确结果，请您在实验前仔细阅读本说明书。
- 4.2 所有试剂使用前恢复至室温(18~26℃)，以免温度过低影响抗原抗体反应。
- 4.3 实验前应用温度计检查温箱温度，温度过高或过低影响 OD 值高低。
- 4.4 包被板反应时严禁堆叠放置，应该平铺且板间有空隙，不要离温箱壁太近。
- 4.5 实验所用移液器及设备应定期校准。
- 4.6 采集的样品要新鲜，并且最好不要溶血。血清标本在 2~8℃放置不要超过 2 天，室温不超过 8 小时，如需长时间放置应储存于-20℃。

【技术支持】 王经理

电话：0543-3403060

仅供兽医诊断使用