

## 猪轮状病毒 VP4 蛋白抗体 (RV VP4 Ab) 酶联免疫分析 (ELISA)

### 试剂盒使用说明书

本试剂盒仅供研究使用。

#### 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轮状病毒 VP4 蛋白抗体(RV VP4 Ab)的含量。

#### 实验原理

本试剂盒应用间接法测定标本中猪轮状病毒 VP4 蛋白抗体 (RV VP4 Ab) 水平。用纯化的抗原包被微孔板,制成固相抗原,往包被微孔中依次加入已知浓度的标准品和未知浓度的待检样品,温育后,加入生物素标记的抗 IgG 抗体,再与链霉亲和素-HRP 结合,形成免疫复合物,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。颜色的深浅和样品中的轮状病毒 VP4 蛋白抗体 (RV VP4 Ab) 呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度 (OD 值),通过标准曲线计算样品中猪轮状病毒 VP4 蛋白抗体 (RV VP4 Ab) 浓度。

#### 试剂盒组成

1	30 倍浓缩洗涤液	20ml×1 瓶	8	标准品 S1 (200ng/L)	0.5ml×1 瓶
2	链霉亲和素-HRP	6ml×1 瓶		标准品 S2 (100ng/L)	0.5ml×1 瓶
3	酶标包被板	12 孔×8 条		标准品 S3 (50ng/L)	0.5ml×1 瓶
4	生物素标记的抗-IgG 抗体	6ml×1 瓶		标准品 S4 (25ng/L)	0.5ml×1 瓶
5	显色剂 A 液	6ml×1 瓶		标准品 S5 (12.5ng/L)	0.5ml×1 瓶
6	显色剂 B 液	6ml×1/瓶	9	说明书	1 份
7	终止液	6ml×1 瓶	10	封板膜	2 张

#### 标本要求

1. 不能检测含 NaN<sub>3</sub> 的样品,因 NaN<sub>3</sub> 抑制辣根过氧化物酶的 (HRP) 活性。
2. 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

#### 操作步骤

1. 根据待测样品数量加上标准品的数量决定所需的板条数。每个标准品和空白孔建议做复孔。每个样品根据自己的数量来定,能使用复孔的尽量做复孔。
2. 加样: 分别设空白孔 (空白对照孔不加样品,其余各步操作相同)、标准品孔、待测样品孔。然后在标准品孔中加入标准品 50μl,在样本反应孔中加入 50 微升样本,盖上封板膜,轻轻振荡混匀,37℃温育 45 分钟。
3. 配液: 将 30 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 30 倍稀释后备用
4. 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 4 次,拍干。



5. 加生物素标记的抗-IgG 抗体：每孔加入生物素标记的抗-IgG 抗体 50 $\mu$ l。37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟
6. 洗涤：操作同 4。
7. 加链霉亲和素-HRP：每孔加入 50 $\mu$ l 的链酶亲和素-HRP，轻轻振荡混匀，37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟。
8. 洗涤：操作同 4。
9. 显色：每孔先加入显色剂 A 50 $\mu$ l，再加入显色剂 B 50 $\mu$ l，轻轻震荡混匀，37 $^{\circ}$ C 避光显色 10 分钟。
10. 终止：每孔加终止液 50 $\mu$ l，终止反应（此时蓝色立转黄色）。
11. 测定：以空白孔调零，450nm 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。

### 计算

以标准物的浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，在坐标纸上绘出标准曲线，根据样品的 OD 值由标准曲线查出相应的浓度；再乘以稀释倍数；或用标准物的浓度与 OD 值计算出标准曲线的直线回归方程式，将样品的 OD 值代入方程式，计算出样品浓度，再乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。

### 注意事项

1. 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。
2. 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。
3. 各步加样均应使用加样器，并经常校对其准确性，以避免试验误差。一次加样时间最好控制在 5 分钟内，如标本数量多，推荐使用排枪加样。
4. 如标本中待测物质含量过高（样本 OD 值大于标准品孔第一孔的 OD 值），请先将样本稀释一定倍数（n 倍）后再测定，计算时请最后乘以稀释倍数（ $\times 5 \times n$ ）。
5. 封板膜只限一次性使用，以避免交叉污染。
6. 本试剂不同批号组分不得混用。显色剂 B 请避光保存。
7. 严格按照说明书的操作进行，试验结果判定必须以酶标仪读数为准。
8. 所有样品，洗涤液和各种废弃物都应按传染病物处理。

### 线性范围：

6ng/L -220ng/L

### 规格：

96 人份/盒

### 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