



**A&E Bio**

# 非洲猪瘟病毒（ASFV）酶联免疫吸附 测定检测试剂盒

## 使用说明书

◆货 号：AE22017

◆规 格：48T/96T

◆保存温度：2-8 °C

◆保 质 期：6 个月

公司网址：[www.ae-bio.com](http://www.ae-bio.com)

E-mail：[aebio666@163.com](mailto:aebio666@163.com)



## 检测原理

试剂盒采用双抗一步夹心法酶联免疫吸附试验（ELISA）。往预先包被非洲猪瘟病毒抗体微孔中，依次加入标本、HRP标记的检测抗原，经过温育并彻底洗涤。用底物TMB显色，TMB在过氧化物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，从而判定标本中非洲猪瘟病毒（ASFV）的存在与否。

## 注意事项

1. 试剂盒保存在 2-8℃，使用前室温平衡 20 分钟。从冰箱取出的浓缩洗涤液会有结晶，这属于正常现象，水浴加热使结晶完全溶解后再使用。
2. 实验中不用的板条应立即放回自封袋中，密封（低温干燥）保存。
3. 预处理后的样本请按照操作步骤用样本稀释液适当稀释以达到试剂盒的最佳检测效果。
4. 严格按照说明书中标明的时间、加液量及顺序进行温育操作。
5. 所有液体组分使用前充分摇匀。

## 样品收集及保存方法

1. **血清：**使用血清分离管收集全血标本，室温（约 25 ℃）放置 2 小时或 4 ℃冰箱放置过夜，3000 转离心 10 分钟或 1000 g 离心 20 分钟，取上清立即检测，或将上清置于-20 ℃或-80 ℃冰箱保存，但应避免反复冻融。
2. **血浆：**用 EDTA 或肝素抗凝管采集血液标本，在 4 ℃条件下 3000 转离心 20 分钟或 1000 g 离心 15 分钟，取上清立即检测，或将上清置于-20 ℃或-80 ℃冰箱保存，但应避免反复冻融。
3. **组织匀浆：**使用预冷的 PBS（pH=7.0-7.4）溶液洗涤组织，尽量洗去残存血液（裂解的红细胞会影响测量结果准确性），称重后将组织剪碎，按 1:9 的质量体积比（即 1 g 组织加入 9 mL 溶液）加入 PBS 溶液（建议加入适量蛋白酶抑制剂），采用玻璃匀浆器充分研磨。后将匀浆液转入离心管中，5000 g 离心 10 分钟，取上清立即检测，或将上清置于-20 ℃或-80 ℃冰箱保存，但应避免反复冻融。



4. **细胞培养上清**：吸取细胞培养液，1000 g 离心 20 分钟，取上清立即检测，或将上清置于 -20 °C 或 -80 °C 冰箱保存，但应避免反复冻融。
5. **其他标本**：视具体情况确定，腹腔积液、胸腔积液和关节积液等的收集和存储方法同细胞培养上清。
6. **样品外观**：样品在液态时应澄清透明，处理时应尽量通过离心去除悬浮物和漂浮物。
7. **样品保存**：样本收集后如在一周内检测，可置于 4 °C 保存；若不能及时检测，请按一次使用量进行小份分装，置于 -20 °C（1 个月内检测）或 -80 °C（半年内检测）保存，避免反复冻融。

## 自备物品

1. 酶标仪（检测波长 450 nm）。
2. 高精度移液器及枪头：0.5-10  $\mu$ L、2-20  $\mu$ L、20-200  $\mu$ L 和 100-1000  $\mu$ L。
3. 37°C 恒温孵育箱。
4. 蒸馏水或去离子水。

## 试剂盒组成

名称	96T	48T	备注
微孔酶标板	12 孔×8 条	12 孔×4 条	无
阴性对照	0.5ml	0.5ml	无
阳性对照	0.5ml	0.5ml	无
样本稀释液	6mL	3mL	无
检测抗原-HRP	10mL	5mL	无
20×洗涤缓冲液	25mL	15mL	按说明书进行稀释
底物 A	6mL	3mL	无
底物 B	6mL	3mL	无
终止液	6mL	3mL	无
封板膜	2 张	2 张	无
说明书	1 份	1 份	无
自封袋	1 个	1 个	无

## 检测前准备工作

1. 提前 10 分钟将试剂盒从冰箱中取出，平衡至室温（20-25 °C）。
2. 1×洗涤缓冲液配制：按 10 mL 20×洗涤缓冲液+190 mL 蒸馏水或去离子水的比例稀释洗涤缓冲液。冰箱放置的洗涤缓冲液可能出现结晶，属正常现象，可放置在室温，待其充

本试剂盒仅供科学研究，不得用于医学诊断。



分溶解后再配制 1×洗涤缓冲液。

## 操作步骤

1. 从室温平衡 20min 后的铝箔袋中取出所需板条，剩余板条用自封袋密封放回 4℃。
2. 设置阴、阳性对照孔和样本孔，阴、阳性对照孔中加入阴性对照、阳性对照各 50 μL；
3. 待测样本孔先加待测样本 10 μL，再加样本稀释液 40 μL；
4. 随后阴、阳性对照孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的检测抗原 100 μL，用封板膜封住反应孔，37℃水浴锅或恒温箱温育 60min。
5. 弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液，静置 1min，甩去洗涤液，吸水纸上拍干，如此重复洗板 5 次（也可用洗板机洗板）。
6. 每孔加入底物 A、B 各 50 μL，37℃避光孵育 15min。
7. 每孔加入终止液 50 μL，15min 内，在 450nm 波长处测定各孔的 OD 值。

## 结果判断

1. 试验有效性：阳性对照孔 OD 值平均值  $\geq 1.00$ ；  
阴性对照孔 OD 值平均值  $\leq 0.15$ 。
2. 临界值（Cut off）计算：临界值=阴性对照孔平均值+0.15
3. 阴性判断：样品 OD 值 < 临界值（Cut off），样品为阴性
4. 阳性判断：样品 OD 值 > 临界值（Cut off），样品为阳性

## 试剂盒性能

1. 准确性：阳性对照孔 OD 值平均值  $\geq 1.00$ ；阴性对照孔 OD 值平均值  $\leq 0.15$ ，说明试验结果有效。
2. 特异性：不与其它可溶性结构类似物交叉反应。
3. 重复性：板内、板间变异系数均小于 15%。
4. 贮藏：2-8℃，避光防潮保存。
5. 有效期：6 个月



# A&E Bio

## 免责声明

1. 本试剂盒仅供科学研究使用，不得用于临床检验或人体实验，否则一切后果由实验者承担，本公司概不负责。
2. 请严格按照说明书要求进行实验操作，违反说明书操作规范，造成后果的由实验者承担。

本试剂盒仅供科学研究，不得用于医学诊断。