

**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伪狂犬病毒 gB 蛋白（PRV-gB）表达。

**实验原理：**

本试剂盒应用双抗体夹心法测定标本中猪伪狂犬病毒 gB 蛋白（PRV-gB）表达。用纯化的抗体包被微孔板，制成固相抗体，可与样品中伪狂犬病毒 g B 蛋白（PRV-gB）相结合，经洗涤除去未结合的抗原和其他成分后再与 HRP 标记的抗体结合，形成抗体-抗原-酶标抗体复合物，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。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度（OD 值）与 CUTOFF 值相比较，从而判定标本中猪伪狂犬病毒 gB 蛋白（PRV-gB）的存在与否。

**试剂盒组成**

1	30 倍浓缩洗涤液	20ml×1 瓶	7	终止液	6ml×1 瓶
2	酶标试剂	6ml×1 瓶	8	阳性对照	0.5ml × 1 瓶
3	酶标包被板	12 孔×8 条	9	阴性对照	0.5ml × 1 瓶
4	样品稀释液	6ml×1 瓶	10	说明书	1 份
5	显色剂 A 液	6ml×1 瓶	11	封板膜	2 张
6	显色剂 B 液	6ml×1/瓶	12	密封袋	1 个

**标本要求**

- 1 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
2. 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。

**操作步骤**

- 1.编号：将样品对应微孔按序编号，每板应设阴性对照2孔、阳性对照2孔、空白对照1孔（空白对照孔不加样品及酶标试剂，其余各步操作相同）
- 2.加样：分别在阴、阳性对照孔中加入阴性对照、阳性对照 50μl。然后在待测样品孔先加样品稀释液 40μl，然后再加待测样品 10μl。加样将样品加于酶标板孔底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀，
3. 温育：用封板膜封板后置 37℃温育 30 分钟。
4. 配液：将 30 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 30 倍稀释后备用
5. 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 5 次，拍干。
6. 加酶：每孔加入酶标试剂 50μl，空白孔除外。
7. 温育：操作同 3。
8. 洗涤：操作同 5。

9. 显色：每孔先加入显色剂 A50 $\mu$ l，再加入显色剂 B50 $\mu$ 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。

计算和结果判定：

试验有效性：阳性对照孔平均值 $\geq$ 1.00；阴性对照平均值 $\leq$ 0.20

临界值（CUTOFF）计算：临界值=阴性对照孔平均值+0.15

阴性判定：样品 OD 值 < 临界值（CUTOFF）者为猪伪狂犬病毒 gB 蛋白（PRV-gB）阴性

阳性判定：样品 OD 值  $\geq$  临界值（CUTOFF）者为猪伪狂犬病毒 gB 蛋白（PRV-gB）阳性。

注意事项

1. 操作严格按照说明书进行，本试剂不同批号组分不得混用。
2. 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。
3. 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。
4. 封板膜只限一次性使用，以避免交叉污染。
5. 底物请避光保存。
6. 试验结果判定必须以酶标仪读数为准，使用双波长检测时，参考波长为 630nm
7. 所有样品，洗涤液和各种废弃物都应按传染物处理。终止液为 2M 的硫酸，使用时必须注意安全。

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