羊产气荚膜梭菌α毒素抗体检测试剂盒（酶联免疫法）

使用说明书

【产品名称】

通用名：羊产气荚膜梭菌α毒素抗体检测试剂盒（酶联免疫法）

英文名：Test Kit for Antibodies to Alpha-Toxin gene of Clostridium Perfringens（ELISA）

【包装规格】 96T×1/盒、96T×2/盒、96T×5/盒

【预期用途】 羊产气荚膜梭菌病是由产气荚膜梭菌（Clostridium Perfringens）引起的，该菌是动物生存环境中常见的一种梭菌，它能分解有机质中的糖，并产生大量气体和毒素，导致动物机体组织坏死、中毒甚至死亡。感染羊后可引起羔羊痢疾、羊猝疽、肠毒血症等疾病，严重危害养羊业的发展。

本试剂用于检测羊血清中产气荚膜梭菌α毒素抗体，可用于羊三联四防疫苗免疫效果评价。

【原　　理】

本试剂盒由预包被产气荚膜梭菌α毒素蛋白抗原的酶标板、酶标记物及其他配套试剂组成，应用酶联免疫法（ELISA）原理检测羊血清、血浆样本中α毒素抗体。实验时在酶标板中加入对照血清和待检样本，经温育后若样品中含有α毒素抗体，则将与酶标板上抗原结合，经洗涤除去未结合的其他成分后；再加入酶标记物，与酶标板上抗原抗体复合物发生特异性结合；再经洗涤除去未结合的酶标记物，在孔中加TMB底物液，与酶标结合物反应形成蓝色产物，显色深浅与样品中的特异性抗体含量成正相关；加入终止液终止反应后，产物变为黄色；用酶标仪在450nm波长测定各反应孔中的吸光值，即可知样品是否含有产气荚膜梭菌α毒素抗体。

【试剂盒组成】

序号	名称	规格/96T×1	规格/96T×2	规格/96T×5
1	酶标记物	11ml×1(红盖)	11ml×2(红盖)	26ml×2(红盖)
2	样品稀释液	50ml×1(黄盖)	50ml×1(黄盖)	200ml×1(透明)
3	20X 浓缩洗涤液	40ml×1(白盖)	40ml×1(白盖)	200ml×1(透明)
4	底物液 A	6ml×1(白盖)	11ml×1(白盖)	26ml×1(白盖)
5	底物液 B	6ml×1(黑盖)	11ml×1(棕盖)	26ml×1(黑盖)
6	终止液	6ml×1(黄盖)	11ml×1(黄盖)	26ml×1(黄盖)
7	阳性对照	1.0 ml×1(红盖)	1.5 ml×1(红盖)	2.0 ml×1(红盖)
8	阴性对照	1.0 ml×1(绿盖)	1.5 ml×1(绿盖)	2.0 ml×1(绿盖)
9	酶标板	96T×1	96T×2	96T×5
10	盖板膜	1	2	5
11	自封袋	1	1	2
12	说明书	1	1	1
13	稀释板	1	2	5

【储存及有效期】 2～8℃保存，有效期 12 个月。

包被板开封后请于 2～8℃避光保存，避免受潮。使用期限为 2 个月。

【适用仪器】 含 450nm、630nm 波长的酶标仪，37℃恒温设备，可调微量移液器。

【样品准备】

1.取动物全血按常规方法制备血清，要求血清清亮，无溶血、无污染。样品 1 周内可于 2～8℃保存，长期需置-20℃保存。

2.用样品稀释液将待检血清按 50 倍稀释（如 4μl 血清加入 196μl 样品稀释液中，混匀）。阴、阳性对照不用稀释。

3.浓缩洗涤液使用前应恢复至室温使沉淀溶解，然后用蒸馏水或去离子水作 20 倍稀释成**工作洗涤液**(如 19 份蒸馏水或去离子水+1 份浓缩洗涤液)。

【检验方法】

1.使用前将试剂盒置室温 30 分钟，恢复至室温。

2.取所需用量酶标板条，设阴性/阳性对照各 2 孔，未用的板条尽快密封，2～8℃保存。

3.阴、阳性对照孔分别加入阴、阳性对照 100μl；样品孔每孔加入稀释后的样品 100μl。

注：样本稀释比例相当于 1:50。

4.混匀，盖好盖板膜,置 37℃（推荐水浴）避光反应 30 分钟。

5.甩去孔内液体，每孔加 350μl **工作洗涤液**，静置 30 秒后弃去，重复洗涤 5 次，最后一次拍干。

6.每孔加酶标记物 100μl，盖好盖板膜，置 37℃避光反应 30 分钟。

7.洗涤，同步骤 5。

8.每孔依次加底物液 A、底物液 B 各 50μl，混匀，盖好盖板膜，37℃避光反应 10 分钟。

9.每孔加终止液 50μl，混匀，于 450nm(可用 630nm 作参比波长）测定各孔吸光值（A 值）。

【参考值】 实验正常的情况下，阴性对照的平均OD值即OD_{NC}应≤0.3，阳性对照的平均OD值即OD_{PC}应≥0.6。

【检验结果的判定】

1.样品的 OD 值即 ODs；

2.阈值计算：SP 值=（OD_S-OD_{NC}）/（OD_{PC}-OD_{NC}）；

SP 值≥0.2，结果判定为阳性；SP 值＜0.2，结果判定为阴性。

3.本实验结果为阴性时表明羊只抗体水平不足，建议补打相应疫苗。

【试验方法的局限性】

该试验仅作为定性检测羊血清、血浆中产气荚膜梭菌α毒素抗体，根据 SP 值高低可作抗体水平强、中、弱的粗略评估。

【注意事项】

1.实验操作时需戴手套、穿工作衣，严格健全和执行消毒隔离制度，各种实验废弃物都应按传染物处理。

2.终止液具有腐蚀性，应避免接触皮肤和衣物，如不慎接触请立即用大量自来水冲洗。

3.酶标板从冷藏环境中取出时应恢复至室温方可开袋，未用完的酶标板需放入有干燥剂的密封袋中保存。

4.浓缩洗涤液在低温时容易结晶，使用时需恢复至室温以完全溶解。

5.洗涤时各孔均需加满液体，防止孔口有游离酶不能洗净。

6.用于检测的样品应保持新鲜。

7.试验结果的判定必须以酶标仪读数为准。

8.不同批号试剂组分不得混用。