



INSTRUCTION MANUAL



FOR RESEARCH USE ONLY; NOT FOR THERAPEUTIC OR DIAGNOSTIC APPLICATIONS!

PLEASE READ THROUGH ENTIRE procedure BEFORE BEGINNING!

<http://zcibio.com>

牛抗甲型肝炎病毒IgG抗体（HAV IgG）试剂盒（ELISA）

使用说明书

Cat No:ZC-50361

- 本试剂盒用于体外定性检测血清、血浆、组织匀浆及相关液体样本中 牛抗甲型肝炎病毒IgG抗体 (HAV IgG)。
- 有效期：6个月
- 保存条件：2-8℃

 仅用于研究；不用于治疗或诊断应用！请在开始前通读整个过程！

实验原理

试剂盒采用间接法酶联免疫吸附试验（ELISA）。往预先包被牛抗甲型肝炎病毒IgG抗体（HAV IgG）捕获抗原的包被微孔中，依次加入标本、阴性和阳性对照，再加入HRP标记的检测抗体，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。颜色的深浅和样品中的牛抗甲型肝炎病毒IgG抗体（HAV IgG）呈正相关。用酶标仪在450nm 波长下测定吸光度（OD 值），判定阴阳性。

样本处理及要求

- 1. 血清：**将收集于血清分离管的全血标本在室温放置2小时或4℃过夜，然后1000×g离心20分钟，取上清即可，或将上清置于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。
- 2. 血浆：**用EDTA或肝素作为抗凝剂采集标本，并将标本在采集后的30分钟内于2-8℃ 1000×g离心15分钟，取上清即可检测，或将上清置于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。
- 3. 组织匀浆：**用预冷的PBS (0.01M, pH=7.4)冲洗组织，去除残留血液（匀浆中裂解的红细胞会影响测量结果），称重后将组织剪碎。将剪碎的组织与对应体积的PBS（一般按1:9的重量体积比，比如1g的组织样品对应9mL的PBS，具体体积可根据实验需要适当调整，并做好记录。推荐在PBS中加入蛋白酶抑制剂）加入玻璃匀浆器中，于冰上充分研磨。为了进一步裂解组织细胞，可以对匀浆液进行超声破碎，或反复冻融。最后将匀浆液于5000×g离心5~10分钟，取上清检测。
- 4. 细胞培养物上清或其它生物标本：**请1000×g离心20分钟，取上清即可检测，或将上清置于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。

注：标本溶血会影响最后检测结果，因此溶血标本不宜进行此项检测。

需要而未提供的试剂和器材

1. 酶标仪（450nm）
2. 高精度加样器及枪头：0.5-10uL、2-20uL、20-200uL、200-1000uL
3. 37℃恒温箱
4. 蒸馏水或去离子水

试剂盒组成

名称	96 孔配置	48 孔配置	备注
微孔酶标板	96 孔	48 孔	无
阴性对照	0.3mL	0.3mL	无
阳性对照	0.3mL	0.3mL	无
样本稀释液	6mL	3mL	无
检测抗体-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

注意事项

1. 严格按照规定的时间和温度进行温育以保证准确结果。所有试剂都必须在使用前达到室温 20-25℃。使用后立即冷藏保存试剂。
2. 洗板不正确可以导致不准确的结果。在加入底物前确保尽量吸干孔内液体。温育过程中不要让微孔干燥掉。
3. 消除板底残留的液体和手指印，否则影响 OD 值。
4. 底物显色液应呈无色或很浅的颜色，已经变蓝的底物液不能使用。
5. 避免试剂和标本的交叉污染以免造成错误结果。
6. 在储存和温育时避免强光直接照射。
7. 平衡至室温后再打开密封袋以防水滴凝聚在冷板条上。
8. 任何反应试剂不能接触漂白溶剂或漂白溶剂所散发的强烈气体。任何漂白成分都会破坏试剂盒中反应试剂的生物活性。
9. 不能使用过期产品。
10. 如果可能传播疾病，所有的样品都应管理好，按照规定的程序处理样品和检测装置。

试剂准备

试剂盒从冷藏环境中取出应在室温平衡后方可使用。

20×洗涤缓冲液的稀释：蒸馏水按1：20稀释，即1份20×洗涤缓冲液加19份蒸馏水。

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. 设置阴性对照孔、阳性对照孔和样本孔，阴性、阳性对照孔各加 50 μ L 对照品，样本孔中加入待测样本 50 μ L，空白孔不加。
3. 除空白孔外，标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的检测抗体 100 μ L，用封板膜封住反应孔，37℃水浴锅或恒温箱温育 60min。
4. 弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液（350 μ L），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）。
5. 每孔加入底物 A、B 各 50 μ L，37℃避光孵育 15min。
6. 每孔加入终止液 50 μ L，15min 内，在 450nm 波长处测定各孔的 OD 值。

实验结果计算

1. 阴性对照OD值：小于0.2。
2. 阳性对照OD值：大于0.8。
3. 阳性判断（Cut-Off值）：阴性对照OD值+0.25，样本OD值大于阈值，判定为阳性，反之，为阴性。
4. 重复性：板内变异系数小于15%。
5. 储藏：2-8℃避光密封保存。

附言

ELISA 法手工测定的影响因素

ELISA 法具有灵敏度高、特异性强、重复性好的特点，并具有操作简便、无放射性危害的优点，因而多年来广泛应用于血站和医院的实验室中，但在测定中常会出现一些误差和问题。我们通过几年的实验观察，认为影响结果的因素有如下方面。

1. 试验仪器

(1) 加样器是否经过校正，酶免测定血清用量很少，如手工加样器的性能不好，吸取样品不精确，会使结果忽高忽低。

(2) 每次洗板前，应检查洗板机针孔有无堵塞。

2 . 操作

(1) 检测前先将试剂盒从冰箱取出置室温平衡 20min 后使用，试剂用完及时放回冰箱冷藏，以免造成试验结果假性降低。

(2) 加样时注意勿触及包被板底部，以免擦伤包被物使抗体（抗原）脱落而影响实验结果的准确性。

(3) 洗涤不充分，会使结果假性增高，过分洗涤呈假阴性。

(4) 比色时应保持包被孔底部无异物、无水汽，特别是冬季板从 37℃ 水浴箱取出时，底部留有水汽，应将板底擦干后进行比色，水汽或孔内气泡也会使 OD 值升高。

(5) 抗原与抗体反应达到完全平衡，依赖于温度与时间。温度高于 45℃ 易引起失活及标记物脱落，温度低于 4℃，影响反应速度。总之，由于 ELISA 实验的影响因素较多，在实际工作中必须操作规范、仔细，避免和排除各种因素的影响，使之得到准确可靠的检验结果。

www.zcibio.com

Shanghai ZCIBIO Technology Co., Ltd.

TEL:021-65681082

Email:zcibio@163.com