



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101846682 A

(43) 申请公布日 2010. 09. 29

(21) 申请号 201010201993. 0

(22) 申请日 2010. 06. 17

(71) 申请人 新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心

地址 830002 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市
碱泉一街 380 号

(72) 发明人 徐兵 热娜·吐尔地 雷刚 蒋卫
丁雄杰 唐建国

(74) 专利代理机构 乌鲁木齐合纵专利商标事务
所 65105

代理人 汤洁

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/535 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页

(54) 发明名称

检测动物鼠疫抗体的酶联免疫吸附试验夹心
法试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及动物鼠疫疫情监测与鼠疫诊断技术领域, 是一种检测动物鼠疫抗体的酶联免疫吸附试验 (ELISA) 夹心法试剂盒, 包括酶标记抗原、抗原包被酶标板、抑制用鼠疫 F1 抗原; 所述抗原包被酶标板为鼠疫 F1 抗原包被酶标板, 所述酶标记抗原为冻干辣根过氧化物酶标记鼠疫 F1 抗原。间接法一种酶标记第二抗体只能检测一种动物的抗体; 本发明检测动物鼠疫抗体 ELISA 夹心法试剂盒的有益效果是, 被测物是鼠疫 F1 抗体, 标本经高浓度杀菌剂杀菌, 检测过程安全; 被测抗体经包被抗原和酶标抗原两次特异性选择结合, 提高了检测的特异性; 酶标仪检测 OD 值具有定量的意义, 可在野外现场应用; 增加了抑制试验程序, 提高了检测结果的准确性。

1. 一种检测动物鼠疫抗体的酶联免疫吸附试验夹心法试剂盒,其特征包括酶标记鼠疫抗原 1 支、鼠疫 F1 抗原包被板 1 块、抑制用冻干鼠疫 F1 抗原 1 支、酶标记物保存液 2ml×1 支、10×PBS. T 20ml×1 支、鼠疫 F1 抗体阳性对照 2ml×1 支、阴性对照 2ml×1 支、显色液 A 液 6ml×1 支、显色液 B 液 6ml×1 支、显色终止液 6ml×1 支、1% 硫柳汞 2ml×1 支; 所述抗原包被板为鼠疫 F1 抗原包被酶标板,所述酶标记抗原为冻干辣根过氧化物酶标记鼠疫 F1 抗原。

2. 根据权利要求 1 所述的检测动物鼠疫抗体的酶联免疫吸附试验夹心法试剂盒,其特征鼠疫 F1 抗原包被酶标板按下述方法得到:

(1) 包被用试剂:包被缓冲液:0.05mol/LNa₂CO₃ 溶液 4 份与 0.05mol/LNaHCO₃ 6 份混合;

包被液:含鼠疫 F1 抗原浓度 0.1-0.5 微克/毫升的包被缓冲液;

饱和包被液:包被缓冲液 1000ml,加牛血清白蛋白 0.1g 或新生小牛血清 20ml;

PBS. T:10×PBS. T 用 0.9% NaCl 稀释 10 倍;

(2) 鼠疫 F1 抗原包被酶标板:测定包被液适用鼠疫 F1 抗原浓度,每管加包被液 200 微升,28-37°C 湿盒放置 4 小时,4-10°C 放置 4-16 小时;

(3) 饱和包被:甩弃酶标板管内的包被液,每管加饱和包被液 200 微升,28-37°C 湿盒放置 3 小时;

(4) 甩弃酶标板管内饱和包被液,在吸水纸上拍去管中水珠;每管加 PBS. T 200 微升浸洗,28-37°C 湿盒放置 3 小时;甩弃 PBS. T,流水冲洗 5 次,在吸水纸上用力拍打酶标板,直到酶标板管内外无可见水珠;

(5) 酶标板直立放入 37°C 温箱,每 30 分钟鼓风或开门通风 1 次,6-12 小时干燥后取出,酶标板经上述处理后即为鼠疫 F1 抗原包被酶标板;

(6) 将鼠疫 F1 抗原板装入塑料袋,封口;4-10°C 干燥保存;

在上述方法中:溶液浓度除注明外均为重量/容量。

3. 根据权利要求 1 所述的检测动物鼠疫抗体的酶联免疫吸附试验夹心法试剂盒,其特征鼠疫 F1 抗原包被酶标板按下述方法得到:

(1) 过碘酸钠活化辣根过氧化物酶:辣根过氧化物酶的 RZ ≥ 3.0 简称 HRP,称取 HRP 5mg 装入 12×120mm 试管,加入蒸馏水 1ml,摇动使 HRP 溶解;加入新鲜配制的 1.3% 过碘酸钠水溶液 0.5ml,混匀置 4-10°C 30 分钟;加入浓度按容量/容量的 1% 的乙二醇水溶液 0.5ml,室温 20-37°C 放置 30 分钟;

(2) 透析法标记鼠疫 F1 抗原:纯化的 5mg/ml 鼠疫 F1 抗原溶液 1ml,与活化的 HRP 混匀,装入透析袋,用 0.05mol/LpH9.6 碳酸盐缓冲液 4-10°C 透析 12-16 小时;加入 0.5% 硼氢化钠溶液 0.2ml,置 4-10°C 冰箱中 2 小时;

(3) 纯化酶标记物:透析袋移入 0.01mol/LpH7.2 磷酸盐缓冲液 200ml 中透析 6-12 小时,换 PBS 液 2 次;3000×g 离心 10 分钟取上清,上清即为酶标记鼠疫 F1 抗原溶液,ELISA 夹心法测定效价,效价应在 1:6000 以上;

(4) 分装冻干:酶标记鼠疫 F1 抗原溶液用容量/容量含 50% 新生小牛血清的 0.01mol/LpH7.2 PBS 稀释到效价 1:100,分装,冻干,-20°C 保存;

在上述方法中:溶液浓度除注明外均为重量/容量。

检测动物鼠疫抗体的酶联免疫吸附试验夹心法试剂盒

技术领域

[0002] 本发明涉及动物鼠疫疫情监测与鼠疫诊断技术领域,是一种检测动物鼠疫抗体的酶联免疫吸附试验夹心法试剂盒。

背景技术

[0004] 鼠疫是我国《传染病法》规定的甲类传染病之一,是由鼠疫杆菌引起的一种动物源性烈性传染病,啮齿类是鼠疫的主要宿主动物和传染源。我国已发现鼠疫自然疫源地 12 个类型,分布于 19 个省区、近 300 个县(市),面积 130 多万 km^2 ,动物间鼠疫处于持续活跃状态,人间鼠疫连年发生,远距离传播的危险性增加。我国在疫源地内设有专业鼠疫监测机构,监测结果是实施鼠疫控制措施的重要依据,免疫学方法检测鼠疫 F1 抗体是鼠疫监测工作的重要内容,并已列入了《鼠疫诊断标准》WS279-2008。鼠疫监测工作中检测 F1 抗体的标本主要是采自野生动物,多数是各种小型啮齿类动物,野外工作条件差,很难保证标本质量,腐败变质的标本也要进行检验,间接血凝试验检测腐败变质标本常出现假阳性反应,有时高滴度非特异性凝集反应掩盖阳性反应,导致阳性标本出现阴性结果;胶体金试验检测鼠疫抗体不能定量,只有定性的意义;已知 200 余种动物可自然感染鼠疫,酶联免疫吸附试验间接法一种酶标第二抗体只能检测一种动物的抗体,全面监测疫源地内的动物,就要制备多种酶标第二抗体,不仅工作量大,而且不同种动物的酶标第二抗体间效价差异大,很难比较不同种动物间的鼠疫抗体含量,影响疫情监测工作中对动物鼠疫流行强度的评估。

发明内容

[0006] 本发明提供了一种检测动物鼠疫抗体的酶联免疫吸附试验夹心法试剂盒,克服了现有鼠疫监测与诊断技术中存在的问题,本发明是通过应用酶联免疫吸附试验夹心法(以下简称:ELISA 夹心法),用于检测各种动物血清、胸腔心血洗液、脏器组织浸液中的鼠疫菌的 F1 抗体的方法,经多次改进,现已制成具体有效的检测动物鼠疫抗体的 ELISA 夹心法试剂盒,为动物鼠疫监测和诊断提供了准确、稳定、简便的检测试剂盒。

[0007] 本发明的技术方案是通过以下措施来实现的:一种检测动物鼠疫抗体的 ELISA 夹心法试剂盒,其包括酶标记鼠疫抗原 1 支、鼠疫 F1 抗原包被板 1 块、抑制用冻干鼠疫 F1 抗原 1 支、酶标记物保存液 $2\text{ml} \times 1$ 支、 $10 \times \text{PBS}$ $T20\text{ml} \times 1$ 支、鼠疫 F1 抗体阳性对照 $2\text{ml} \times 1$ 支、阴性对照 $2\text{ml} \times 1$ 支、显色液 A 液 $6\text{ml} \times 1$ 支、显色液 B 液 $6\text{ml} \times 1$ 支、显色终止液 $6\text{ml} \times 1$ 支、1%硫柳汞 $2\text{ml} \times 1$ 支;所述抗原包被板为鼠疫 F1 抗原包被酶标板,所述酶标记抗原为冻干辣根过氧化物酶标记鼠疫 F1 抗原。

[0008] 对上述本发明的技术方案可进一步进行如下的选择或/和优化:

上述鼠疫 F1 抗原包被酶标板按下述方法得到:

(1) 包被用试剂:包被缓冲液:0.05mol/L Na_2CO_3 溶液 4 份与 0.05mol/L NaHCO_3 6 份混合;

包被液:含鼠疫 F1 抗原浓度 0.1-0.5 $\mu\text{g/ml}$ (即微克/毫升)的包被缓冲液;

饱和包被液:包被缓冲液 1000ml,加牛血清白蛋白 0.1g 或新生小牛血清 20ml;

PBS. T:10×PBS. T 用 0.9% NaCl 稀释 10 倍;

(2) 鼠疫 F1 抗原包被酶标板:测定包被液适用鼠疫 F1 抗原浓度,每管加包被液 200 μ l (即微升),28-37°C 湿盒放置 4 小时,4-10°C 放置 4-16 小时;

(3) 饱和包被:甩弃酶标板管内的包被液,每管加饱和包被液 200 μ l (即微升),28-37°C 湿盒放置 3 小时;

(4) 甩弃酶标板管内饱和包被液,在吸水纸上拍去管中水珠;每管加 PBS. T200 μ l (即微升)浸洗,28-37°C 湿盒放置 3 小时;甩弃 PBS. T,流水冲洗 5 次,在吸水纸上用力拍打酶标板,直到酶标板管内外无可见水珠;

(5) 酶标板直立放入 37°C 温箱,每 30 分钟鼓风或开门通风 1 次,6-12 小时干燥后取出,酶标板经上述处理后即为鼠疫 F1 抗原包被酶标板;

(6) 将鼠疫 F1 抗原板装入塑料袋,封口;4-10°C 干燥保存;

在上述方法中:溶液浓度除注明外均为重量/容量。

[0009] 上述冻干辣根过氧化物酶标记鼠疫 F1 抗原即 HRP-F1 按下述方法得到:

(1) 过碘酸钠活化辣根过氧化物酶:辣根过氧化物酶的 RZ ≥ 3.0 简称 HRP,称取 HRP5mg 装入 12×120mm 试管,加入蒸馏水 1ml,摇动使 HRP 溶解;加入新鲜配制的 1.3%过碘酸钠水溶液 0.5ml,混匀置 4-10°C30 分钟;加入浓度按容量/容量的 1%的乙二醇水溶液 0.5ml,室温 20-37°C 放置 30 分钟;

(2) 透析法标记鼠疫 F1 抗原:纯化的 5mg/ml 鼠疫 F1 抗原溶液 1ml,与活化的 HRP 混匀,装入透析袋,用 0.05mol/LpH9.6 碳酸盐缓冲液 4-10°C 透析 12-16 小时;加入 0.5%硼氢化钠溶液 0.2ml,置 4-10°C 冰箱中 2 小时;

(3) 纯化酶标记物:透析袋移入 0.01mol/LpH7.2 磷酸盐缓冲液即 PBS200ml 中透析 6-12 小时,换 PBS 液 2 次;3000×g 离心 10 分钟取上清,上清即为酶标记鼠疫 F1 抗原溶液,ELISA 夹心法测定效价,效价应在 1:6000 以上;

(4) 分装冻干:酶标记鼠疫 F1 抗原溶液用容量/容量含 50%新生小牛血清的 0.01mol/LpH7.2PBS 稀释到效价 1:100,分装,冻干,-20°C 保存;

在上述方法中:溶液浓度除注明外均为重量/容量。

[0010] 本发明的有益效果:间接法一种酶标记第二抗体只能检测一种动物的抗体;本发明检测动物鼠疫抗体 ELISA 夹心法试剂盒的有益效果是,被测物是鼠疫 F1 抗体,标本经高浓度杀菌剂杀菌,检测过程安全;被测抗体经包被抗原和酶标抗原两次特异性选择结合,提高了检测的特异性;酶标仪检测 OD 值具有定量的意义,目测判定结果,可在无电源的野外现场应用;增加了抑制试验程序,排除了非特异性反应对阳性结果的干扰,保证检测结果的准确性。ELISA 夹心法检测动物鼠疫抗体,酶标记鼠疫 F1 抗原替代酶标记第二抗体,一种酶标记物可以检测各种动物的鼠疫 F1 抗体,减少了制备多种酶标第二抗体的麻烦及其质量差异对结果的影响,特别适用于鼠疫疫源地调查和疫情监测。

具体实施方式

[0012] 本发明不受下述实施例的限制,可依据本发明的技术方案和实际情况来确定具体的实施方式。

[0013] 下述实施例中,无特别说明均为常规方法;溶液浓度除注明外均为重量/容量。

[0014] 实施例1:检测动物鼠疫抗体的酶联免疫吸附试验夹心法试剂盒制备

一、检测动物鼠疫抗体的酶联免疫吸附试验夹心法试剂盒制备

(一) 检测动物鼠疫抗体的酶联免疫吸附试验夹心法试剂盒的组成:

1. 鼠疫 F1 抗原板	8 管 × 12 条	1 块
2. 酶标记鼠疫 F1 抗原	冻干	1 支
3. 抑制用鼠疫 F1 抗原	冻干	1 支
4. 酶标记物保存液	2ml	1 支
5. 10×PBS. T	20ml	1 瓶
6. 鼠疫 F1 抗体阳性对照	2ml	1 支
7. 鼠疫 F1 抗体阴性对照	2ml	1 支
8. TMB 显色液	A 液 6ml 1 瓶 B 液 6ml	1 瓶
9. 显色终止液	6ml	1 瓶
10. 1%硫柳汞	2ml	1 瓶

(二) 各组分的制备方法

1. 鼠疫 F1 抗原板制备:

(1) 包被用试剂:包被缓冲液:0.05mol/LNa₂CO₃ 溶液 4 份与 0.05mol/LNaHCO₃ 6 份混合。

[0015] 包被液:含鼠疫 F1 抗原浓度 0.1-0.5 μg/ml (即微克/毫升)的包被缓冲液;

饱和包被液:包被缓冲液 1000ml,加牛血清白蛋白 0.1g 或新生小牛血清 20ml;

PBS. T:10×PBS. T 用 0.9% NaCl 稀释 10 倍。

[0016] (2) 鼠疫 F1 抗原包被酶标板:测定包被液适用鼠疫 F1 抗原浓度,每管加包被液 200 μl (即微升),28-37°C 湿盒放置 4 小时,4-10°C 放置 4-16 小时;

(3) 饱和包被:甩弃酶标板管内的包被液,每管加饱和包被液 200 μl (即微升),28-37°C 湿盒放置 3 小时;

(4) 甩弃酶标板管内饱和包被液,在吸水纸上拍去管中水珠;每管加 PBS. T 200 μl (即微升)浸洗,28-37°C 湿盒放置 3 小时;甩弃 PBS. T,流水冲洗 5 次,在吸水纸上用力拍打酶标板,直到酶标板管内外无可见水珠;

(5) 酶标板直立放入 37°C 温箱,每 30 分钟鼓风或开门通风 1 次,6-12 小时干燥后取出,酶标板经上述处理后即为鼠疫 F1 抗原包被酶标板;

(6) 将鼠疫 F1 抗原板装入塑料袋,封口;4-10°C 干燥保存;

在上述方法中:溶液浓度除注明外均为重量/容量。

[0017] 2. 辣根过氧化物酶标记鼠疫 F1 抗原即 HRP-F1 制备:

(1) 过碘酸钠活化辣根过氧化物酶:辣根过氧化物酶的 RZ ≥ 3.0 简称 HRP,称取 HRP 5mg 装入 12×120mm 试管,加入蒸馏水 1ml,摇动使 HRP 溶解;加入新鲜配制的 1.3%过碘酸钠水溶液 0.5ml,混匀置 4-10°C 30 分钟;加入浓度按容量/容量的 1%的乙二醇水溶液 0.5ml,室温 20-37°C 放置 30 分钟;

(2) 透析法标记鼠疫 F1 抗原:纯化的 5mg/ml 鼠疫 F1 抗原溶液 1ml,与活化的 HRP 混匀,装入透析袋,用 0.05mol/LpH9.6 碳酸盐缓冲液 4-10°C 透析 12-16 小时;加入 0.5%硼氢

化钠溶液 0.2ml, 置 4-10°C 冰箱中 2 小时;

(3) 纯化酶标记物:透析袋移入 0.01mol/LpH7.2 磷酸盐缓冲液即 PBS200ml 中透析 6-12 小时,换 PBS 液 2 次;3000×g 离心 10 分钟取上清,上清即为酶标记鼠疫 F1 抗原溶液,ELISA 夹心法测定效价,效价应在 1:6000 以上;

(4) 分装冻干:酶标记鼠疫 F1 抗原溶液用容量/容量含 50%新生小牛血清的 0.01mol/LpH7.2PBS 稀释到效价 1:100,分装,冻干,-20°C 保存;

在上述方法中:溶液浓度除注明外均为重量/容量。

[0018] 3. 抑制用鼠疫 F1 抗原:0.1mol/LpH7.2 磷酸盐缓冲液 30ml,加硫柳汞 0.1g,新生小牛血清 20ml,加鼠疫 F1 抗原 2.5mg,混匀,分装,每支 0.2ml,冻干,-20°C 保存。

[0019] 4. 酶标记物保存液即甘油.PB 制备:0.1mol/LpH7.2 磷酸盐缓冲液与等量丙三醇混合。

[0020] 5. 10×PBS.T 制备:0.1mol/LNa₂HPO₄8 份和 0.1mol/LNaH₂PO₄2 份混合,每 1000ml,加吐温-200.5ml,新生小牛血清 10ml,硫柳汞 0.1g。

[0021] 6. 鼠疫 F1 抗体阳性对照制备:0.01mol/LpH7.2PBS480ml,加新生小牛血清 10ml,效价 1:8000 鼠疫 F1 抗体血清 10ml,硫柳汞 0.1g。

[0022] 7. 阴性对照制备:0.01mol/LpH7.2PBS500ml,加新生小牛血清 10ml,加硫柳汞 0.1g。

[0023] 8. TMB 显色液制备:

A 液:0.2mol/LNa₂HPO₄500ml 与 0.1mol/L 柠檬酸 500ml 混合,加 30%的双氧水 0.5ml,硫柳汞 0.1g。

[0024] B 液:3.3-5.5-四甲基联苯胺 250mg,无水乙醇 100ml,加水 900ml,硫柳汞 0.1g。

[0025] 9. 显色终止液制备:蒸馏水 450ml 加硫酸 50ml。

[0026] 10. 1%硫柳汞:硫柳汞 1g,NaCl1g,加蒸馏水至 100ml。

[0027] 上述制备好的各种试剂定量分装,装入检测鼠疫抗体的 ELISA 夹心法试剂盒。

[0028] (三) 试剂盒质量标准

按说明书配制试剂,并按 ELISA 夹心法程序检测,检测 0.01 μg/ml 鼠疫 F1 抗体液,OD 值 > 0.2;检测阴性标本,OD 值 < 0.1。

[0029] 实施例 2:检测动物鼠疫抗体的酶联免疫吸附试验夹心法试剂盒的应用方法

一、ELISA 夹心法检测鼠疫 F1 抗体的器材准备与试剂配制

1. PBS.T:10×PBS.T 用 0.9%NaCl 稀释 10 倍。

[0030] 2. HRP-F1 贮存液:每支 HRP-F1 (冻干剂) 加酶标记物保存液溶解,混匀,-20°C 保存,有效期 6 个月。

[0031] HRP-F1 应用液:HRP-F1 贮存液按说明书规定的量用 PBS.T 稀释,4°C 可保存 10 天,室温 1 天内使用。

[0032] 3. 抑制用鼠疫 F1 抗原:按说明书规定的量用 PBS.T 溶解混匀。

[0033] 4. 显色液:显色液 A 液和 B 液等量混合,避光保存 1 小时内使用。

[0034] 二、ELISA 夹心法检测鼠疫抗体的标本准备

1. 动物采血,分离血清,加硫柳汞或升汞杀菌防腐。

2. 死亡小型动物,剪开胸腔,剪碎心脏,吸出胸腔心血洗液,2000×g 离心 5 分钟或静置

1 小时后取上清液, 紧急情况下, 可用注射器针头插入棉球抽滤。加硫柳汞或升汞杀菌防腐;

3. 装血清、胸腔心血洗液试管封口后, 用消毒液浸泡消毒试管外部, 供免疫学检验。

[0035] 三、ELISA 夹心法检测鼠疫抗体初筛(定性) 试验

1. 排列鼠疫 F1 抗原包被酶标板(兰头) 反应小管: 根据标本和阳性、阴性对照的数量, 把小管安装在编号的酶标反应板支架上, 每管加 PBS. T50 μ l。

[0036] 2. 加标本: 按登记编号位置每管加 1 份标本 50 μ l, 置于湿盒内。适宜温度为 28 $^{\circ}$ C, 静置 90 分钟, 甩去反应液。20-40 $^{\circ}$ C 均可进行, 低于 28 $^{\circ}$ C 时, 温度每低 1 $^{\circ}$ C 延长反应时间 2 分钟, 可获得与适宜温度基本相同的结果。

[0037] 3. 冲洗: 流水冲洗鼠疫 F1 包被酶标板, 甩去反应液, 立即给每小管注满水, 甩去水, 再注满水, 再甩去水, 如此反复冲洗 5 次; 酶标板管口向下, 在吸水纸、滤纸上拍去鼠疫 F1 包被酶标板孔内与表面水珠。野外可用水壶、洗瓶装煮沸冷却澄清的泉水、河水冲洗反应板, 方法同上。

[0038] 4. 加酶标记鼠疫 F1 抗原应用液: 鼠疫 F1 抗原板每小管加酶标记鼠疫 F1 抗原应用液 100 μ l, 加盖、置于湿盒内。反应温度同 3. (2), 反应时间 60 分钟, 冲洗方法同 3。

[0039] 5. 显色: 鼠疫 F1 抗原包被酶标板每小管加 TMB 显色液的 A 液和 B 液各 50 μ l, 反应 20 分钟, 阳性反应呈兰色; 阴性反应为无色或显色很淡。

[0040] 6. 终止显色: 每小管加显色终止液 50 μ l, 显色液兰色变为黄色, 阴性仍为无色或颜色很淡。

[0041] 7. 观测记录试验结果: 目测: 平持反应板, 距白色背景 15-20mm, 从板的正上方向下观察。阴性: (-) 无色或颜色很淡; 阳性: (+) 颜色明显可见, (++) 浅黄棕色, (+++) 与阳性对照颜色相同, (++++) 深棕黄色比阳性对照颜色深。

[0042] 比色计比色: TMB 显色液用波长 450nm, 阴性标本为对照, 标本 OD > 0.20 为阳性。

[0043] 8. 登记检验结果:

四、检测反应滴度试验与抑制试验(复试)

检测鼠疫 F1 抗体初筛显色(+)、(++)、(+++)、(++++)标本, 全部要同步做检测反应滴度试验和抑制试验。

[0044] (一) 检测反应滴度试验:

1. 阳性标本按(+)、(++)、(+++)、(++++)分别排列, 并详细记录。排列小管: 根据标本数和反应强弱排列小管, 每小管加 PBS. T100u1。一般(+), (++)用 4 个小管; (+++)用 6-8 个小管; (++++)用 8-12 个小管, 亦可将(++++)标本稀释 32-64 倍后再测反应滴度。

[0045] 2. 每排首管加 1 份待检标本 100u1, 吹吸 3 次, 移入第 2 管, 如此连续 2 倍稀释到最末管; 阳性对照标本同步稀释, 加盖、置于湿盒内反应。

[0046] 3-8. 操作步骤同初筛试验, (+) 为阳性反应滴度终点。

[0047] (二) 抑制试验:

1. 初筛阳性的标本都要做抑制试验, 抑制试验和测反应滴度试验同步进行。

[0048] 2. 抑制试验与测反应滴度试验的不同之处为 PBS. T 含鼠疫 F1 抗原 1-2 μ g/ml。

[0049] (三) 观测登记检验结果:

1. 观测检验结果:

目测 :阳性(+) 颜色明显可见的最高稀释度为反应滴度终点。

[0050] 比色计比色 :标本 OD > 0.20 的最高稀释度为反应滴度终点。

[0051] 2. 检测滴度试验、抑制试验反应滴度用 $1:2^n$ 表示, n 为 2 的倍数。

[0052] 3. 标本的抑制试验反应滴度比检测滴度试验反应滴度低 2 个或 2 个以上滴度为抑制试验阳性,抑制试验阳性的标本才能判定为检测鼠疫 F1 抗体试验阳性。

专利名称(译)	检测动物鼠疫抗体的酶联免疫吸附试验夹心法试剂盒		
公开(公告)号	CN101846682A	公开(公告)日	2010-09-29
申请号	CN201010201993.0	申请日	2010-06-17
[标]申请(专利权)人(译)	新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心		
申请(专利权)人(译)	新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心		
当前申请(专利权)人(译)	新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心		
[标]发明人	徐兵 热娜吐尔地 雷刚 蒋卫 丁雄杰 唐建国		
发明人	徐兵 热娜·吐尔地 雷刚 蒋卫 丁雄杰 唐建国		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/535		
代理人(译)	汤洁		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及动物鼠疫疫情监测与鼠疫诊断技术领域，是一种检测动物鼠疫抗体的酶联免疫吸附试验(ELISA)夹心法试剂盒，包括酶标记抗原、抗原包被酶标板、抑制用鼠疫F1抗原；所述抗原包被酶标板为鼠疫F1抗原包被酶标板，所述酶标记抗原为冻干辣根过氧化物酶标记鼠疫F1抗原。间接法一种酶标记第二抗体只能检测一种动物的抗体；本发明检测动物鼠疫抗体ELISA夹心法试剂盒的有益效果是，被测物是鼠疫F1抗体，标本经高浓度杀菌剂杀菌，检测过程安全；被测抗体经包被抗原和酶标抗原两次特异性选择结合，提高了检测的特异性；酶标仪检测OD值具有定量的意义，可在野外现场应用；增加了抑制试验程序，提高了检测结果的准确性。