



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101839915 A

(43) 申请公布日 2010.09.22

(21) 申请号 201010201991.1

G01N 33/535 (2006.01)

(22) 申请日 2010.06.17

G01N 33/543 (2006.01)

(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 热娜·吐尔地 雷刚 蒋卫
闫化奎 徐兵 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)

权利要求书 1 页 说明书 6 页

(54) 发明名称

检测动物鼠疫 F1 抗原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 F1 抗原的酶联免疫吸附试验夹心法试剂盒,其包括酶标记抗体 1 支,抗体包被板 1 块,甘油 .PB 液 2ml,10×PBS. T20ml,鼠疫 F1 抗原阳性对照 2ml,阴性对照 2ml,抑制用鼠疫 F1 抗体 5ml,TMB 显色液 A 液 6ml,TMB 显色液 B 液 6ml,显色终止液 6ml ;1% 硫柳汞 2ml。其有益效果:被测物是鼠疫 F1 抗原,可用杀菌剂杀菌后检测,过程安全;被测鼠疫 F1 抗原经包被抗体和酶标抗体 2 次特异性选择结合,提高了检测的特异性;减少了酶标第二抗体酶标步骤,降低了非特异性显色;用酶标仪检测结果,有定量意义;目测判定结果,为无电源的野外现场创造了方便条件;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 F1 抗原的酶联免疫吸附试验夹心法试剂盒,其特征在于包括酶标记抗体 1 支,抗体包被板 1 块,甘油 .PB 液 2ml,10×PBS. T20ml,鼠疫 F1 抗原阳性对照 2ml,阴性对照 2ml,抑制用鼠疫 F1 抗体 1 支,显色液 A 液 6ml,显色液 B 液 6ml,显色终止液 6ml ;1% 硫柳汞 2ml ;所述酶标记抗体是冻干的用辣根过氧化物酶标记的鼠疫 F1 抗体即 HRP-F1Ab,所述抗体包被板是用鼠疫 F1 抗体包被酶标板即 F1Ab 板。

2. 根据权利要求 1 所述的检测动物鼠疫 F1 抗原的酶联免疫吸附试验夹心法试剂盒,其特征用辣根过氧化物酶标记的鼠疫 F1 抗体即 HRP-F1Ab 按下述方法得到:

(1) 辣根过氧化物酶的 RZ ≥ 3.0 即 HRP,称取 HRP5mg,装入 12mm×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 30min ;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 30min ;加入纯化的 5mg/ml 鼠疫 F1 抗体溶液 1ml,混匀;

(2) 把试管内的液体装入透析袋,置 4-10°C,用 0.05mol/LpH9.6 碳酸盐缓冲液透析 12-16h,将 0.5% 硼氢化钠溶液 0.2ml 加入透析袋,混匀,4-10°C 冰箱中静置 2h;

(3) 将透析袋移入 0.01mol/LpH7.2 磷酸盐缓冲液即 PBS 中透析 6-12h,其间换 PBS2 次;

(4) 将透析袋内的液体移入离心管,3000×g 离心 10min,上清液为辣根过氧化物酶标记鼠疫 F1 抗体即 HRP-F1Ab 溶液原液;取上清液,用酶联免疫吸附试验夹心法测定效价应在 1:6000 以上;用浓度按容量 / 容量的含 50% 新生小牛血清 PBS 稀释,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。

3. 根据权利要求 1 所述的检测动物鼠疫 F1 抗原的酶联免疫吸附试验夹心法试剂盒,其特征用鼠疫 F1 抗体包被板即 F1Ab 板按下述方法得到:

(1) 包被用试剂:包被缓冲液:0.05mol/LpH9.6 的碳酸盐缓冲液;

鼠疫 F1 抗体包被液:包被缓冲液 1000ml,加鼠疫 F1 抗体 0.1-0.5mg;

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 液稀释 10 倍;

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

(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 3h;甩弃酶标板管内饱和包被液,在吸水纸上拍去管中水珠;

(4) 每管加 PBS. T200 微升浸洗,28-37°C 湿盒放置 3h;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 30min 鼓风或开门通风 1 次,6-12h 干燥后取出,酶标板经上述处理后即为鼠疫 F1 抗体包被酶标板;

(6) 将鼠疫 F1 抗体板装入塑料袋,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。

检测动物鼠疫 F1 抗原的酶联免疫吸附试验夹心法试剂盒

技术领域

[0001] 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 F1 抗原的酶联免疫吸附试验夹心法试剂盒。

背景技术

[0002] 鼠疫是我国《传染病防治法》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。我国已发现鼠疫自然疫源地 12 个类型,分布于 19 个省区、292 个县市旗,面积 131 万 km²。20 世纪 90 年代以来,动物间鼠疫持续处于活跃状态,人间鼠疫连年发生,鼠疫远距离高速传播的危险性增加。啮齿类是鼠疫的主要宿主动物和传染源,可自然感染鼠疫动物近 200 种。我国有专业机构对疫源地内鼠疫进行监测,《全国鼠疫监测方案》监测动物鼠疫采用分离培养鼠疫菌和反相间接血凝试验检测鼠疫 F1 抗原;新鲜标本分离培养鼠疫菌,最快也要 24h 才能出结果,且分离培养方法只能检测鼠疫菌活菌,不能从使用过抗菌素、沾染杀菌剂或腐败陈旧的感染过鼠疫的动物标本获得阳性结果;F1 抗原是鼠疫菌的特异性抗原成份,反相间接血凝试验检测鼠疫 F1 抗原,腐败变质标本常出现非特异性凝集,有时高滴度非特异性凝集掩盖阳性反应,造成检验结果错误。ELISA 间接法检测鼠疫 F1 抗原,步骤多,背景显色深。自毙动物是鼠疫监测工作中检测鼠疫菌及其 F1 抗原的重要标本,多数已腐败甚至已经干枯,国内外都十分关注检测腐败变质标本中鼠疫 F1 抗原的准确、稳定、简便、快速的方法与试剂的研究。

[0003]

发明内容

本发明提供了一种检测动物鼠疫 F1 抗原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)检测各种动物血液、器官、脏器组织浸液中的鼠疫菌的 F1 抗原的方法,经多次改进,现已制成具体有效的检测动物鼠疫 F1 抗原的 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、快速的检测试剂与器具。

[0004] 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 F1 抗原的 ELISA 夹心法试剂盒,其包括酶标记抗体 1 支,抗体包被板 1 块,甘油 .PB 液 2ml,10×PBS. T20ml,鼠疫 F1 抗原阳性对照 2ml,阴性对照 2ml,抑制用鼠疫 F1 抗体 1 支,显色液 A 液 6ml,显色液 B 液 6ml,显色终止液 6ml;1%硫柳汞 2ml;所述酶标记抗体是冻干的用辣根过氧化物酶标记的鼠疫 F1 抗体即 HRP-F1Ab,所述抗体包被板是用鼠疫 F1 抗体包被酶标板即 F1Ab 板。

[0005] 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:

上述冻干的用辣根过氧化物酶标记的鼠疫 F1 抗体即 HRP-F1Ab 按下述方法得到:

(1) 辣根过氧化物酶的 RZ ≥ 3.0 即 HRP,称取 HRP5mg,装入 12mm×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 4-10⁰C30min;加入浓度按容量 / 容量的 1%的乙二醇水溶液 0.5ml,室温 20-37⁰C 放置

30min ;加入纯化的 5mg/ml 鼠疫 F1 抗体溶液 1ml, 混匀 ;

(2) 把试管内的液体装入透析袋, 置 4-10°C, 用 0.05mol/LpH9.6 碳酸盐缓冲液透析 12-16h, 将 0.5% 硼氢化钠溶液 0.2ml 加入透析袋, 混匀, 4-10°C 冰箱中静置 2h ;

(3) 将透析袋移入 0.01mol/LpH7.2 磷酸盐缓冲液即 PBS 中透析 6-12h, 其间换 PBS2 次 ;

(4) 将透析袋内的液体移入离心管, 3000×g 离心 10min, 上清液为辣根过氧化物酶标记鼠疫 F1 抗体即 HRP-F1Ab 溶液原液 ;取上清液, 用酶联免疫吸附试验夹心法测定效价应在 1:6000 以上 ;用浓度按容量 / 容量的含 50% 新生小牛血清 PBS 稀释, 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。

[0006] 上述鼠疫 F1 抗体包被板即 F1Ab 板按下述方法得到 :

(1) 包被用试剂 :包被缓冲液 :0.05mol/LpH9.6 的碳酸盐缓冲液 ;

鼠疫 F1 抗体包被液 :包被缓冲液 1000ml, 加鼠疫 F1 抗体 0.1-0.5mg ;

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 液稀释 10 倍。

[0007] (2) 鼠疫 F1 抗体包被酶标板 :测定包被液适用鼠疫 F1 抗体浓度, 每管加包被液 200 μ l (即微升), 28-37°C 湿盒放置 4h, 4-10°C 放置 4-16h ;

(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 3h ;甩弃酶标板管内饱和包被液, 在吸水纸上拍去管中水珠 ;

(4) 每管加 PBS. T 200 μ l (即微升) 浸洗, 28-37°C 湿盒放置 3h ;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 30min 鼓风或开门通风 1 次, 6-12h 干燥后取出, 酶标板经上述处理后即为鼠疫 F1 抗体包被酶标板 ;

(6) 将鼠疫 F1 抗体板装入塑料袋, 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。

[0008] 本发明的有益效果是 :被测物是鼠疫 F1 抗原而不是鼠疫活菌, 被测物可用杀菌剂杀菌后检测, 检测过程安全 ;被测鼠疫 F1 抗原经包被抗体和酶标抗体 2 次特异性选择结合, 提高了检测的特异性 ;减少了酶标第二抗体反应步骤, 降低了非特异性显色, 用酶标仪检测结果, 有定量的意义, 目测判定结果, 为在无电源的野外现场应用创造了方便条件 ;增加了抑制试验程序, 提高了检测结果的准确性。

具体实施方式

[0009] 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。

[0010] 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。

[0011] 实施例 1 :检测动物鼠疫抗原的 ELISA 夹心法试剂盒制备

一、检测动物鼠疫抗原的 ELISA 夹心法试剂盒制备

(一) 检测动物鼠疫抗原的 ELISA 夹心法试剂盒的组成 :

1. 鼠疫 F1 抗体包被板即 F1Ab 板	8×12 管板	1 块
2. 辣根过氧化物酶标记鼠疫 F1 抗体即 HRP-F1Ab :	冻干	1 支
3. 甘油 . PB	2ml	1 支
4. 10×PBS. T	20ml	1 瓶
5. 鼠疫 F1 抗原阳性对照 :	2ml	1 支
6. 阴性对照 :	2ml	1 支
7. 抑制用鼠疫 F1 抗体 :	冻干	1 支
8. TMB 显色液 :	A 液 6ml 1 支 B 液 6ml 1 支	
9. 显色终止液即 10% H ₂ SO ₄ :	6ml	1 支
10. 1% 硫柳汞 :	2ml	1 支

(二) 各组分的制备方法 :

1. 鼠疫 F1 抗体包被板 (F1Ab 板) 制备 :

(1) 包被用试剂 : 包被缓冲液 : 0.05mol/LpH9.6 的碳酸盐缓冲液 ;

鼠疫 F1 抗体包被液 : 包被缓冲液 1000ml, 加鼠疫 F1 抗体 0.1-0.5mg ;

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 液稀释 10 倍。

[0012] (2) 鼠疫 F1 抗体包被酶标板 : 测定包被液适用鼠疫 F1 抗体浓度, 每管加包被液 200 μ l (即微升), 28-37°C 湿盒放置 4h, 4-10°C 放置 4-16h ;

(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 3h ; 甩弃酶标板管内饱和包被液, 在吸水纸上拍去管中水珠 ;

(4) 每管加 PBS. T 200 μ l (即微升) 浸洗, 28-37°C 湿盒放置 3h ; 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 30min 鼓风或开门通风 1 次, 6-12h 干燥后取出, 酶标板经上述处理后即为鼠疫 F1 抗体包被酶标板 ;

(6) 将鼠疫 F1 抗体板装入塑料袋, 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。

[0013]

2. 制备辣根过氧化物酶标记鼠疫 F1 抗体 (HRP-F1Ab) :

(1) 辣根过氧化物酶的 RZ ≥ 3.0 即 HRP, 称取 HRP 5mg, 装入 12mm×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 30min ; 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 30min ; 加入纯化的 5mg/ml 鼠疫 F1 抗体溶液 1ml, 混匀 ;

(2) 把试管内的液体装入透析袋, 置 4-10°C, 用 0.05mol/LpH9.6 碳酸盐缓冲液透析 12-16h, 将 0.5% 硼氢化钠溶液 0.2ml 加入透析袋, 混匀, 4-10°C 冰箱中静置 2h ;

(3) 将透析袋移入 0.01mol/LpH7.2 磷酸盐缓冲液即 PBS 中透析 6-12h, 其间换 PBS 2 次 ;

(4) 将透析袋内的液体移入离心管, 3000×g 离心 10min, 上清液为辣根过氧化物酶标记鼠疫 F1 抗体即 HRP-F1Ab 溶液原液 ; 取上清液, 用酶联免疫吸附试验夹心法测定效价应在 1:6000 以上 ; 用浓度按容量 / 容量的含 50% 新生小牛血清 PBS 稀释, 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。

[0014]

3. 甘油 .PB 制备 :0.1mol/LpH7.2 磷酸盐缓冲液与等量丙三醇混合。

[0015] 4. 10×PBS. T 制备 :0.1mol/LNa₂HPO₄8 份和 0.1mol/LNaH₂PO₄2 份混合,每 900ml,加吐温 -200.5ml,新生小牛血清 100ml,硫柳汞 0.1g。

[0016] 5. 鼠疫 F1 抗原阳性对照制备 :0.01mol/LpH7.2PBS100ml,加新生小牛血清 2ml,加硫柳汞 0.05g,加鼠疫 F1 抗原 0.2mg。

[0017] 6. 鼠疫 F1 抗原阴性对照制备 :0.01mol/LpH7.2PBS100ml,加新生小牛血清 2ml,加硫柳汞 0.05g。

[0018] 7. TMB 显色液制备 :A 液 :0.2mol/LNa₂HPO₄ 与 0.1mol/L 柠檬酸等量混合。

[0019] B 液 :3.3-5.5- 四甲基联苯胺 50mg,无水乙醇 20ml,加水 180ml。

[0020] 8. 显色终止液制备 :蒸馏水 90ml 加硫酸 10ml。

[0021] 9. 1%硫柳汞 :蒸馏水 100ml,加硫柳汞 1g, NaCl1g。

[0022] 10. 抑制用鼠疫 F1 抗体 :0.01mol/LpH7.2PBS30ml,新生小牛血清 15ml,加滴度为 1 :8000 的鼠疫 F1 抗体 5ml,加硫柳汞 0.1g,混匀,分装,每支 0.2ml,冻干。

[0023] (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 0.01ug/ml 鼠疫 F1 抗原液,吸光度 A₄₅₀ 值 > 0.2 ;检测阴性标本,吸光度 A₄₅₀ 值 < 0.1。

[0024] 实施例 2 :检测动物鼠疫抗原的 ELISA 夹心法试剂盒的应用方法

一、ELISA 夹心法检测动物鼠疫 F1 抗原的试剂配制

1. PBS. T :10×PBS. T 用 0.85%NaCl 稀释 10 倍。

[0025] 2. HRP-F1 抗体贮存液 :每支 HRP-F1 抗体(冻干剂)加甘油 -PB2ml 溶解,混匀,-20°C 保存,保质期 6 个月。

[0026] HRP-F1 抗体应用液 :HRP-F1 抗体贮存液用 PBS. T 稀释 30 倍,4°C 保存 10 天。

[0027] 3. F1 抗原阳性对照 :每支 F1 抗原阳性对照(冻干剂)用 PBS. T2ml 溶解混匀。

[0028] 4. 阴性对照 :每支阴性对照(冻干剂)用 PBS. T2ml 溶解混匀。

[0029] 5. 抑制用鼠疫 F1 抗体 :用 PBS. T5ml 溶解混匀。

[0030] 6. TMB 显色液 :显色液 A 液和 B 液等量混合,避光保存 4h 内使用。

[0031] 二、标本准备

1. 组织块 :新鲜、腐败或干枯的脏器、肌肉组织块,放入乳钵内剪碎,研磨成糊状,按组织块重量的 2 倍加生理盐水,继续研磨制成混悬液。

[0032] 2. 骨头 :用纱布包裹骨头,用剪刀或骨钳剪断骨头的两端,采取红色骨髓 ;如骨髓干枯,可剪断骨头的一端,用注射器注入少量生理盐水,30min 后,反复吹吸数次后吸出,或将另一端打开,直接冲入试管内 ;也可用纱布包裹骨头,砸碎骨头骨髓丰富的部位,2 倍容量的生理盐水中浸泡 30min,反复冲洗,收集混悬液。

[0033] 3. 混悬液、浸出液、心血混悬液 2000×g 离心 5min 或静置后取上清液,按 1ml 加 1%硫柳汞或 1%升汞盐水 0.1ml 混匀。紧急情况下,可用注射器针头插入棉球抽滤。

[0034] 4. 试管封口后,用消毒液浸泡消毒试管外部。

[0035] 三、ELISA 夹心法检测鼠疫 F1 抗原初筛(定性) 试验

1. 排列 F1Ab 板小管条(兰头):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板支架上,每管加 PBS. T50 μ l。

[0036] 2. 按登记编号位置每管加 1 份标本 50 μ l (即微升),防止标本相互污染,置于湿盒或塑料袋内。

[0037] 适宜温度为 28 $^{\circ}$ C,静置 90min。(20-40 $^{\circ}$ C 均可进行,低于 28 $^{\circ}$ C 时,温度每降低 1 $^{\circ}$ C 延长反应时间 2min,可获得与适宜温度基本相同的结果。)甩去酶标板管内的液体。

[0038] 3. 流水冲洗酶标板使每管都注满水,甩去水,再注满水,再甩去水,如此反复冲洗 5 次;管口向下,在吸水纸、滤纸上拍去酶标板表面水珠。(野外可用水壶、洗瓶装煮沸冷却澄清的泉水、河水冲洗酶标板。)

4. 每小管加 HRP-F1Ab 应用液 100 μ l (即微升),酶标板置于湿盒或塑料袋内;反应温度同三.2,反应时间 60min。冲洗方法同 3。

[0039] 5. 显色:每小管加 TMB 显色液的 A 液和 B 液各 50 μ l,反应 15min,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:加终止液(10% H₂SO₄) 50 μ l, TMB 显色液兰色变为黄色,阴性仍为无色或颜色很淡。

[0041] 7. 记录试验结果:目测:平持酶标板,距白色背景 150-200mm,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,(++) 浅黄色,(+++)与阳性对照颜色相同,(++++)深黄色比阳性对照颜色深。

[0042] 酶标仪测定:TMB 显色液测 OD_{A450} 值,阴性标本为对照,标本 OD 值 > 0.20 为阳性。

[0043] 8. 登记检验结果:

四、复试(ELISA 夹心法检测鼠疫抗原酶标滴度(定量) 试验与抑制试验)

检测鼠疫 F1 抗原初筛显色(+),(++),(+++),(++++)标本,全部要做检测反应滴度试验和抑制试验。

[0044] (一) 检测鼠疫抗原反应滴度(定量) 试验

1. 初筛阳性标本,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,每管加 PBS. T100 μ l (即微升);一般(+),(++)用 4 个小管,(+++)用 6-8 个小管,(++++)用 8-12 个小管。(++++)的标本可稀释 16 倍或 32 倍再复试。

[0045] 2. 稀释标本:每排首管加 1 份待检标本 100 μ l (即微升),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,置于湿盒或塑料袋内。

[0046] 3-8. 操作步骤同初筛试验。

[0047] (二) 检测鼠疫抗原抑制试验

初筛阳性标本,都要做抑制试验,抑制试验和测反应滴度试验同步进行。抑制试验与测反应滴度试验的不同之处为 PBS. T 含滴度为 1:64-1:128 鼠疫 F1 抗体。

[0048] (三) 观测登记检验结果

1. 观测登记检验结果:

目测:阳性(+) 颜色明显可见的最高稀释度为阳性反应滴度终点。

[0049] 酶标仪测定:标本 OD 值 > 0.20 的最高稀释度为阳性反应滴度终点。

[0050] 2. 检测滴度试验、抑制试验阳性反应滴度,用 1:n 表示,n 为标本阳性反应的稀释

倍数。

[0051] 3. 抑制试验反应滴度比检测滴度试验阳性反应滴度低 2 个或 2 个以上滴度为检测鼠疫 F1 抗原试验阳性。

专利名称(译)	检测动物鼠疫F1抗原的酶联免疫吸附试验夹心法试剂盒		
公开(公告)号	CN101839915A	公开(公告)日	2010-09-22
申请号	CN201010201991.1	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	热娜吐尔地 雷刚 蒋卫 闫化奎 徐兵 唐建国		
发明人	热娜.吐尔地 雷刚 蒋卫 闫化奎 徐兵 唐建国		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/535 G01N33/543		
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F1抗原的酶联免疫吸附试验夹心法试剂盒，其包括酶标记抗体1支，抗体包被板1块，甘油.PB液2ml，10×PBS.T20ml，鼠疫F1抗原阳性对照2ml，阴性对照2ml，抑制用鼠疫F1抗体5ml，TMB显色液A液6ml，TMB显色液B液6ml，显色终止液6ml；1%硫柳汞2ml。其有益效果：被测物是鼠疫F1抗原，可用杀菌剂杀菌后检测，过程安全；被测鼠疫F1抗原经包被抗体和酶标抗体2次特异性选择结合，提高了检测的特异性；减少了酶标第二抗体酶标步骤，降低了非特异性显色；用酶标仪检测结果，有定量意义；目测判定结果，为无电源的野外现场创造了方便条件；增加了抑制试验程序，提高了检测结果的准确性。