

## 猴四项病毒斑点免疫检测试剂盒 使用说明

猴四项病毒斑点免疫检测试剂盒 (PA5 DIA) 用于检测实验猴血清中抗 B 病毒 (Herpes B virus)、猴 T 细胞趋向性病毒 1 型 (STLV-1)、猴逆转录 D 型病毒 (SRV1, 2, 5) 和猴麻疹病毒 (MEASLES) 四项病毒抗体 IgG。本试剂盒是基于斑点免疫 (Dot Immunoassay) 的基本原理, 使用硝酸纤维膜作为固相载体, 将上述四项病毒抗原和两株作参照的病毒培养细胞按矩阵点布在膜上 (3 列×9 排, 计 27 组)。每组抗原点依序为 Vero 细胞、BV、STLV、麻疹、SRV 和 Raji 细胞。

检测时, 将吸附了待检血清的滤纸条覆盖在抗原点上, 样本中相关病毒抗体和膜上相应抗原发生特异性结合; 然后加入酶标二抗, 与之形成抗原-抗体-酶复合物; 最后加入酶的相应底物, 通过酶促反应, 使相应的抗原点呈现肉眼可见的蓝色斑点, 达到定性检测相关病毒抗体目的。若通过扫描仪或数码相机将膜成像, 对结果可作相对定量分析。本方法操作简便, 流程短, 通量高, 不需要特殊设备, 而且结果可靠, 适合应用于猴场大规模常规筛查, 提高动物质量。

### 提供的试剂及说明 (可供检测样本 500 份)

序号	名称	数量	贮存	说明
1	磷酸盐缓冲试剂 20xWash Buffer	100ml×3 (白色大瓶)	4℃	每 50ml 缓冲试剂加 950ml 去离子水稀释成 1x 洗涤液, 用于配制样本稀释液、稀释二抗和洗涤。
2	样本稀释试剂 Sample dilutant	5g×8 (铝箔袋)		实验前每袋加洗涤液 100ml 配成 5% 样本稀释液, 用于抗原膜封闭和样本稀释, 每张膜需 15ml。
3	显色试剂 Chromogen	125ml×2 (棕色大瓶)		取适量置室温平衡后直接使用, 将膜覆盖即可, 每张膜需 15ml。
4	酶标二抗 AP Conjugate	0.3ml (黑盖冻存管)		临用前加洗涤液稀释 1000 倍后使用。每张膜取 15 ul, 加到 15ml 洗涤液中。
5	临界值对照 (BV 弱阳性) BV +	0.5ml (红盖冻存管)		用前取适量与样本一同稀释 (1:5), 用作指示染色, 至示图中 “+” 时 (约 2-5 分钟) 即可终止反应。
6	阳性对照 (STLV 弱阳性) STLV+	0.5ml (紫盖冻存管)		用前取适量与样本一同稀释 (1:5)
7	阴性对照 (阴性) NC	0.5ml (绿盖冻存管)		用前取适量与样本一同稀释 (1:5)。
8	PA5 抗原膜 DIA Membrane	20 张/盒 (密封袋)		必须戴橡胶手套操作, 每张膜供检 27 份样本 (含对照)。未用完的膜用自封袋密闭存放, 保持干燥。
9	滤纸条 Filter paper strips	600 条 (自封袋)	室温	用来吸附待测血清, 覆盖在抗原膜中相应的一组抗原点上, 进行第一步抗原抗体反应。
10	滤纸垫 Filter paper pad	25 张 (自封袋)		贴膜时垫在抗原膜下, 用来保持第一步抗原抗体反应时膜的湿润。

### 需要但未提供的材料

1. 镊子: 无齿尖头和平头不锈钢镊子;
2. 超纯去离子水或蒸馏水;
3. 稀释血清用小试管 (12×55 mm);
4. 50 ml 离心管, 250 和 2000 ml 可高压灭菌的容量瓶;
5. 恒温培养箱或恒温水浴槽一台;
6. 摇床一台;
7. 震荡仪一台;
8. 20、100、和 1000 ul 可调式移液枪及相应枪头;
9. 连续移液器一把及相应枪头 (5 或 10 ml);
10. 50-100ml 分液器 (用于 2000ml 试剂瓶)。

### 采样和保存

1. 使用不加抗凝剂的采血管, 采静脉血约 1.5ml, 注意不要抽吸过快或震荡, 避免样本溶血;
2. 采血后可静置半小时待血液凝固后再离心, 分离血清用 3000 转/分, 10-15 分钟;
3. 吸出血清, 放到 1.5-2.5 ml 带有密封圈的冷冻管内, 抽吸时不可重复使用枪头, 以免交叉污染;
4. 血清样本可置 4℃ 短暂存放; 若超过五天, 须置 -25℃ 冻存。

## 注意事项

1. 吸取每个样本时都必须更换枪头，避免交叉污染；
2. 操作过程中始终要带手套，避免直接触摸抗原膜；
3. 实验全程要保持抗原膜的湿润，不能让膜晾干；
4. 室温应控制在 22-25℃。

## 溶液准备

1. 将 100ml 磷酸盐缓冲试剂倒入 2000ml 试剂瓶中，加 1900ml 去离子水，配成 1x 洗涤液 (pH 7.2~7.4)；
2. 将 5g 样本稀释试剂加到 100ml 洗涤液中配成 5% 样本稀释液，或根据样本量配制，每 100 个样本需 100ml。此工作液在 4℃ 存放不宜超过 2 天；
3. 染色前半小时将显色剂从冰箱取出，平衡至室温。

## 实验操作步骤

1. **稀释血清** 将稀释样本用的小试管标上相应序号，并按序对应排列在试管架上；用连续移液器在稀释管内各加入 400 ul 样本稀释液；  
再用 100 ul 移液枪分别加入 100 ul 相应待检血清，和试剂盒提供的临界值对照和阳性对照血清。

2. **准备抗原膜** 戴上手套，取出抗原膜，标记编号放在 10×10 cm 的塑料平皿中 (每皿 1-2 张)；加入 15 ml 样本稀释液，置摇床上慢速摆动，室温封闭半小时；封闭结束后，用洗涤液快速洗涤三次，每次一分钟；

然后将抗原膜下垫置厚滤纸一张，注入适量洗涤液将膜和滤纸充分湿润，再倒出多余液体，使膜上不挂有液体。

3. **贴膜** 先将稀释的血清在震荡器上震荡混匀，用尖头镊子轻夹一片提供的小滤纸条一端，将另一端小心浸入稀释的样本中，待纸条全部吸附上液体后提出液面，并将纸条在试管口轻刮 1-2 次，去掉多余液体，然后按序仔细贴覆在抗原膜矩阵上，用吸水纸擦干镊尖，再贴下一个样本；

每张膜有 3 列 9 排共 27 组抗原点，供检 25 个样本以及 2 个对照。按序从上到下贴完左边第一列后，再从左到右贴中列和右列。最后两组抗原点分别贴上临界值对照和阳性对照；

贴膜时，应避免不同样本的滤纸条间接触或太近而造成交叉污染，并详细记录贴膜的顺序。

4. **孵育** 每张膜贴好后，盖上平皿盖，置于水浴箱或恒温箱中 37℃ 孵育 30 分钟。水浴时注意勿将水流入平皿；若用恒温箱，则注意保湿，以免抗原膜被烘干。
5. **洗涤** 孵育结束后，取出平皿，用预先冷却好的洗涤液快速冲去膜上覆盖的滤纸条，弃去滤纸垫；再用洗涤液洗涤 3 遍，每遍 5 分钟，洗涤过程中置平皿于摇床上中速摇动。
6. **酶标二抗** 将提供的酶标二抗按 1:1000 的比例稀释于洗涤液中 (每一块膜取 15 ul 抗体，加入到 15 ml 洗涤液中)，混匀后倒入平皿，使二抗溶液覆盖整块膜，置

室温孵育 30 分钟。

多块膜同时反应时，可将两块膜放在一个平皿内，加 25 ml 二抗溶液，置于摇床上低速摇动 30 分钟。

7. **洗涤** 倒出二抗溶液，将抗原膜用洗涤液洗涤 3 遍，每遍 5 分钟。洗涤时应将平皿放在摇床上中速摇动。最后一遍洗涤后应将液体尽可能控干。
8. **显色** 每皿加入显色试剂 15ml，轻微振动平皿，两张膜可在同一平皿中反应，但需反复翻动。并仔细观察，待临界值对照 (BV+) 染至示图中“+”深度，而背景还很淡时 (约 2-5 分钟，随环境温度而改变) 即可终止反应。
9. **终止** 终止时，将膜用自来水快速洗涤 5 遍，置空气中自然晾干后再判读结果。

## 结果判定

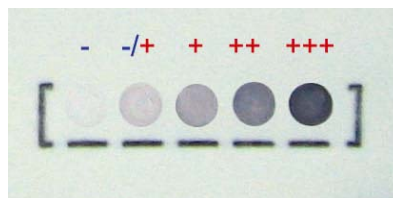
	参照细胞	病毒抗原点	判定
B 病毒 麻疹 SRV	-	-	阴性
	±~+++	同参照细胞一样深	
	-	±	可疑
	±~+++	比参照细胞稍深	
-	+~+++	阳性	
±~+	++~+++		
STLV		-	阴性
		±	可疑
		+~+++	阳性

**阳性 (P):** 若对照细胞点无色或颜色很淡，但病毒抗原点颜色达弱阳性对照深度或更深，相当于示图中“+~+++”深度，则判为阳性；

**可疑 (I):** 若病毒抗原点颜色比相应对照细胞点深，但又比弱阳性对照浅，相当于示图中“+/-”深度，则判为可疑；

**阴性 (N):** 若病毒抗原点无色，或颜色很浅且与相应对照细胞点接近，判为阴性；

对于 B 病毒可疑的动物，建议两周后新采血复检。若仍不能断定，建议将两次血清都寄送 VRL 实验室，用 DIA、ELISA 和蛋白印迹法来综合确认。对于 STLV 和 SRV 可疑或阳性的动物，建议寄送抗凝全血到 VRL 实验室，须用蛋白印迹或 PCR 来进一步确证。对于 MEASLES 可疑或阴性的动物，建议重新接种疫苗。



附图：染色深度和读膜参照