

本试剂盒只能用于科学研究，不得用于医学诊断

烟草花叶病毒（TMV）

ELISA 检测试剂盒

使用说明书

检测原理

试剂盒采用双抗体一步夹心法酶联免疫吸附试验（ELISA）。往预先包被烟草花叶病毒（TMV）抗体的包被微孔中，依次加入标本、标准品、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。用酶标仪在450nm波长下测定吸光度（OD 值），与CUTOFF值相比较，从而判定标本中烟草花叶病毒（TMV）的存在与否。

样品收集、处理及保存方法

1. 样本不能含叠氮钠（ NaN_3 ），因为叠氮钠（ NaN_3 ）是辣根过氧化物酶（HRP）的抑制剂。
2. 标本采集后尽早进行提取，提取按相关文献进行。

3. 植物取液或其它相关样本：请1000 x g离心20分钟，取上清即可检测。

4. 保存：如果样本收集后不及时检测，请按一次用量分装，冻存于 -20°C ，避免反复冻融，在室温下解冻并确保样品均匀地充分解冻。

自备物品

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°C 恒温箱

操作注意事项

1. 试剂盒保存在 $2-8^{\circ}\text{C}$ ，使用前室温平衡20分钟。从冰箱取出的浓缩洗涤液会有结晶，这属于正常现象，水浴加热使结晶完全溶解后再使用。
2. 实验中不用的板条应立即放回自封袋中，密封（低温干燥）保存。
3. 预处理后的样本请按照操作步骤用样本稀释液适当稀释以达到试剂盒的最佳检测效果。

4.严格按照说明书中标明的时间、加液量及顺序进行温育操作。

5.所有液体组分使用前充分摇匀。

试剂盒组成

名称	96 孔配置	48 孔配置	备注
微孔酶标板	12 孔×8 条	12 孔×4 条	无
阴性对照	0.5mL	0.5mL	无
阳性对照	0.5mL	0.5mL	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
样本稀释液	6mL	3mL	无
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

试剂的准备

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

洗板方法

1. 手工洗板：甩尽孔内液体，每孔加满洗涤液，静置 1min 后甩尽

孔内液体，在吸水纸上拍干，如此洗板 5 次。

2. 自动洗板机：每孔注入洗液 350 μ L，浸泡 1min，洗板 5 次。

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. 设置标准品孔和样本孔,标准品孔各加不同浓度的标准品 50 μ L；
3. 样本孔先加待测样本 10 μ L，再加样本稀释液 40 μ L；空白孔不加。
4. 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。
5. 弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液，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）。
6. 每孔加入底物 A、B 各 50 μ L，37℃避光孵育 15min。
7. 每孔加入终止液 50 μ L，15min 内，在 450nm 波长处测定各孔的

OD 值。

结果判断

1. 试验有效性：阳性对照孔 OD 值平均值 ≥ 1.00 ；

阴性对照孔 OD 值平均值 ≤ 0.15 。

2. 临界值（Cut off）计算：临界值=阴性对照孔平均值+0.15

3. 阴性判断：样品 OD 值 < 临界值（Cut off），样品为阴性

4. 阳性判断：样品 OD 值 > 临界值（Cut off），样品为阳性

试剂盒性能

1. 准确性：阳性对照孔 OD 值平均值 ≥ 1.00 ；阴性对照孔 OD 值平均值 ≤ 0.15 ，说明试验结果有效。

2. 特异性：不与其它可溶性结构类似物交叉反应。

3. 重复性：板内、板间变异系数均小于 15%。

4. 贮藏：2-8℃，避光防潮保存。

5. 有效期：6 个月

免责声明

1. 试剂盒仅供研究使用，不得用于临床实验或人体实验，否则所产生的一切后果，由实验者承担，本公司概不负责。

2. 严格按照说明书操作，实验者违反说明书操作，后果由实验者承担。