**四川省职业院校检验检疫技术竞赛**

**生物化学和免疫学检验-血清总蛋白测定+乙肝病毒表面抗体检测试卷（高职组）**

**一、竞赛说明**

1.主要考核医学检验技术专业、卫生检验与检疫技术专业学生对生化检验和免疫学检验基本操作技术的熟练程度和对半自动生化分析仪、酶标仪等常规设备的规范操作能力。

2.本题满分100分，完成时间55分钟。

3.独立完成，不得相互询问或讨论。

4.考核成绩为操作过程评分、操作结果和考核时间评分、职业素养之和。

5.全部操作过程时间和操作后处理时间计入时间限额，超过规定时间将终止操作。

6.设定项目：血清总蛋白（TP）测定（双缩脲法）+乙肝病毒表面抗体检测项目（双抗原夹心酶联免疫吸附法）。

**二、实验原理**

1.血清总蛋白测定原理：血清蛋白质分子中的肽键(-CO-NH-)在碱性溶液中能与试剂中的 Cu2+作用生成稳定的紫红色的络合物，此络合物在540nm处有明显的吸收峰，其溶液吸光度在一定浓度范围内与血清（浆）蛋白质（TP）含量成正比，经与同样处理的蛋白标准液比较，即可求得血清（浆）TP含量。

2. 乙肝表面抗体测定原理（双抗原夹心酶联免疫吸附法）：在微孔板条上预包被HBsAg，加入待测样本及酶标抗原（HBsAg-HRP）试剂进行孵育；样本中的HBsAb与包被抗原和酶标抗原形成“包被抗原-抗体-酶标抗原”复合物；洗板后加入酶底物显色溶液，复合物上连接的HRP催化色原底物发生显色反应。若样品中无HBsAb时，不发生显色反应。

**三、实验器材和试剂**

1.血清总蛋白测定：小号试管4只（使用3只，备用1只），试管架，移液枪1支（规格5～50μl）及配套枪头、枪头盒，1ml、2ml刻度吸管各1支，洗耳球1个，计时器1个，托盘1个。半自动生化分析仪、恒温水浴箱、锐器盒、废液缸、污物缸、垃圾回收桶、胶水、签字笔、记号笔等。

2.乙肝病毒表面抗体检测：微孔板（已用纯化HBsAg包被，96孔），洗耳球1个、试管架1个，手动可调式移液器（已校正）1把及配套枪头、枪头盒、滤纸、冲洗瓶（内装已经稀释的洗涤液）、标记笔、计算器、签字笔、计时器、恒温水浴箱、计时器（孵育专用）、酶标仪、消毒洗手液、面盆、抹布、废液缸、锐器盒，滤纸，移液枪架、振荡器、废液中转箱，医疗废物桶（反应板/杯）

3.实验试剂：双缩脲法总蛋白测定试剂盒、乙肝病毒表面抗体检测试剂盒（含酶标记、酶底物显色溶液、阴性对照、阳性对照）

**四、实验标本**

血清总蛋白测定建议购买质控血清作为标本。乙肝病毒表面抗体检测使用不同浓度无溶血血清标本。

**五、操作步骤**

1.血清总蛋白测定

取3支洁净的小试管，按表1操作如下：

**TP的操作**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **加入物** | **空白管(B)** | **标准管(S)** | **测定管(U)** |
| 生理盐水（μl）  蛋白标准液（μl）  血清标本（μl）  双缩脲试剂（ml） | 25  0  0  2.0 | 0  25  0  2.0 | 0  0  25  2.0 |

混匀，37℃水浴10min，波长540nm，用半自动化生化分析仪读其测定值并打印结果（以上各加液量及参数以选用的试剂盒使用要求为准）。

2.乙肝病毒表面抗体检测

（1）实验准备核对实验仪器和材料，检查试剂和标本，选取所需反应板并做好标记。（设立空白对照孔1孔，阴性对照2孔，阳性对照2孔。阳性对照用红色记号笔，阴性对照用黑色记号笔）。

（2）稀释浓缩洗液 按照说明书要求稀释浓缩液，混匀备用。（已配制好待用）

（3）加待测标本 按照既定顺序依次加入阴性对照（2孔）、阳性对照（2孔）、待测标本（7孔）各50μl，待测。空白对照（1孔）不加。（3min内完成）

（4）加酶结合物 每孔用滴瓶滴加1滴（空白孔不加），通过振荡器充分混匀（时间30s），封板，置37℃水浴箱中孵育25min。（**孵育期间同时进行总蛋白测定操作**）

（5）洗板 取出反应板，弃液、拍干，每孔注满洗涤液，静置5秒后弃液、甩干，重复洗涤5次，在干净的滤纸上拍干。

（6）加显色剂 每孔先后加显色剂A、B各1滴，通过振荡器充分混匀（时间30s），封板，放置37℃水浴箱中避光孵育10min。

（7）终止反应 每孔加入终止液1滴，混匀。

（8）测定 打开电脑软件进行布板、选择酶标仪双波长（450nm/630nm）比色、选用空白孔校零，点击开始，读取各孔OD值，并打印并粘贴结果。

**四川省职业院校检验检疫技术竞赛**

**生化检验和免疫学技术及检验-血清总蛋白测定+乙肝病毒表面抗体检测答题卷（高职组）**

**一、血清总蛋白测定数据记录：**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 血清总蛋白  测定结果 | 结果书写（小数点后两位）： | 打印结果报告粘贴处 |

说明：打印报告单上选手（只写场次、组号和工位号，不得写选手姓名）、现场裁判都需签字确认。

|  |  |
| --- | --- |
| 得 分 |  |
| 裁判签名 |  |

**二、乙肝表面抗体检测数据记录与计算**

1．数据记录与结果计算（将酶标仪测试结果打印并粘贴此处）

|  |
| --- |
| 结果粘贴处 |

|  |  |
| --- | --- |
| 得 分 |  |
| 裁判签名 |  |

|  |
| --- |
|  |

2.计算阳性判定阈值(cut-off)（写出计算公式及过程，结果取3位小数点）

|  |  |
| --- | --- |
| 得 分 |  |
| 裁判签名 |  |

3.报告

阳性标本有：

|  |  |
| --- | --- |
| 得 分 |  |
| 裁判签名 |  |