

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1999—2007

牛病毒性腹泻-粘膜病抗原捕获酶联免疫 吸附试验操作规程

Protocol of antigen captured enzyme - linked immunosorbent assay
for bovine viral diarrhoea-mucosal disease

2007-12-24 发布

2008-07-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
牛病毒性腹泻-粘膜病抗原捕获酶联免疫
吸附试验操作规程

SN/T 1999—2007

*

中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.5 字数 8 千字
2008年2月第一版 2008年2月第一次印刷
印数 1—2 000

*

书号: 155066·2-18459 定价 6.00 元

前 言

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国天津出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：董志珍、侯艳梅、赵祥平、肖妍、霍蕾。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

牛病毒性腹泻-粘膜病抗原捕获酶联免疫 吸附试验操作规程

1 范围

本标准规定了牛病毒性腹泻-粘膜病抗原捕获酶联免疫吸附试验(ELISA)操作方法。
本标准适用于牛病毒性腹泻-粘膜病抗原的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(neq ISO 3696)

3 原理

以边界病病毒特异性抗体包被酶标板,同时加入 BVDV 检测单克隆抗体及样品,样品即与两种抗体结合,形成抗原抗体结合物,洗板后再加入二抗(与抗原抗体复合物结合)及底物,通过测量光密度值而确定样品的结果。

4 试验材料

4.1 牛病毒性腹泻-粘膜病抗原捕获 ELISA 诊断试剂盒

2℃~8℃保存。试剂盒内应包括的物品如下:

- a) 牛病毒性腹泻-粘膜病病毒多克隆抗体包被板;
- b) 抗 BVDV 单克隆检测抗体;
- c) BVDV 阳性对照;
- d) BVDV 阴性对照;
- e) 辣根过氧化物酶(HRP)标记的牛抗鼠抗体;
- f) 10×样品稀释液;
- g) 10×浓缩洗液;
- h) TMB 底物溶液;
- i) 终止液。

4.2 样品的处理

4.2.1 组织

4.2.1.1 使用尽可能新鲜的组织样品,组织可在 2℃~8℃保存 1 个月或长期冷冻保存。组织样品最好为扁桃体、脾脏、小肠及肺脏。

4.2.1.2 用剪刀将 1 g~2 g 的样品剪碎(2 mm~5 mm)。

4.2.1.3 将剪碎的样品置于 10 mL 的离心管中,加入 5 mL 样品稀释液(1×),混匀,室温感作 1 h~2 h。

4.2.1.4 1 500 r/min 离心 10 min,吸取 50 μL 上清液作为检测用样品。按第 7 章进行试验。

4.2.2 外周血液白细胞

4.2.2.1 将肝素或 EDTA 抗凝的血样 10 mL,2 000 r/min 离心 15 min~20 min。

4.2.2.2 用 1 000 μL 移液器小心吸取血沉表层的淡黄色薄膜,重悬于 500 μL 的样品稀释液中,每一个样品换一个吸头。室温放置 1 h,在此期间偶尔漩涡振荡一次,下面继续 4.2.2.6 的操作。

4.2.2.3 如果样品的压缩细胞体积非常小,那么用所有的血细胞来操作(包括红细胞),将细胞转移到 10 mL 离心管中,并加入等体积的 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 0.17 mol/L 的 NH_4Cl 溶液,放入离心管中,室温放置 10 min。

4.2.2.4 将离心管用 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的超纯水(或双蒸水)加满,轻轻地翻转摇匀,2 500 r/min 离心 5 min。

4.2.2.5 弃去上清液,加入 500 μL 样品稀释液(1 \times)到血细胞中,每个样品使用新的枪头涡动混匀,室温中放置 1 h,在此期间偶尔漩涡振荡一次。

4.2.2.6 2 500 r/min,离心 5 min,用上清液作为检测样品,按第 7 章进行试验。

4.2.3 鼻拭子

4.2.3.1 取下拭子头,放入底部有小孔的微型离心管中(可用热针头打空)。将微型离心管放入另一个 Eppendorf 管中,2 500 r/min 离心 5 min。

4.2.3.2 弃去底部有小孔的微型管,并在 Eppendorf 管中加入与获得的粘液等体积的样品稀释液(1 \times),混匀,室温下放置 1 h~2 h。此期间偶尔摇晃一下。然后可按第 7 章操作程序进行试验。

4.2.4 细胞培养物

4.2.4.1 弃去细胞培养液,反复三次冻融后,收集细胞培养液到离心管中,3 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液。

4.2.4.2 加入 500 μL 样品稀释液,振荡器上轻轻混匀,置于室温 1 h,吸取 50 μL 作为检测用样,按第 7 章操作程序进行试验。

5 仪器与设备

5.1 酶标仪(波长 450 nm 或双波长 450 nm/620 nm)。

5.2 振荡器。

5.3 高速台式离心机。

5.4 冰箱。

5.5 温箱。

5.6 8 道或 12 道洗头洗板机。

5.7 8 道或 12 道移液器(50 μL , 300 μL)。

5.8 单道移液器(0.5 μL ~10 μL ; 40 μL ~200 μL ; 200 μL ~1 000 μL 和 2 mL~10 mL)。

5.9 吸头(10 μL , 200 μL , 1 000 μL)。

5.10 剪刀和镊子(处理组织样品)。

5.11 Eppendorf 管。

6 试剂准备

6.1 试剂盒各组分在使用前恢复至室温(20 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$)。

6.2 水:GB/T 6682 所规定的一级水。

6.3 0.17 mol/L NH_4Cl 溶液(提取白细胞用)。

6.4 洗涤液:用蒸馏水将浓缩洗液稀释 10 倍(1:10),如 30 mL 浓缩液加入 270 mL 蒸馏水,混匀备用。稀释用蒸馏水应符合 GB/T 6682 的要求。

7 操作程序

7.1 加抗 BVDV 单克隆检测抗体

用 8 道或者 12 道移液器在每孔中加入 50 μL 抗 BVDV 单克隆检测抗体(试剂盒提供)。

7.2 对照

加 50 μL 阴性对照血清至酶标板的 A1、B1 孔。

加 50 μL 阳性对照血清至酶标板的 A2、B2 孔。

7.3 加样

在酶标板的其他相应孔中各加入 50 μL 已稀释好的被检样品。

7.4 感作

将酶标板封膜后,在振荡器上混合 1 min 后,置 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 下过夜感作(14 h~18 h)或 37 $^{\circ}\text{C}$ 下感作 3 h。

7.5 洗涤

弃掉各孔的液体,每孔加入 250 μL ~300 μL 已稀释好的洗涤液,轻轻振动后甩掉,连续洗涤 5 次。最后一次洗涤后,将酶标板在吸水纸上轻拍,以去除孔内剩余的液体。

7.6 加酶标结合物

每孔加入 100 μL 辣根过氧化物酶(HRP)标记的牛抗鼠抗体。

7.7 感作和洗涤

将酶标板封膜后,置室温下,感作 30 min。重复 7.5 洗涤。

7.8 加底物

每孔加入 100 μL TMB 底物溶液。

7.9 感作

将酶标板置 20 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$ 下黑暗处感作 10 min,从加完第一孔开始计时。

7.10 加终止液

每孔加 100 μL 终止液,终止颜色反应。

7.11 测定吸光值(OD)

酶标仪以空气作为空白对照,于 15 min 内,在 450 nm 波长下测量和记录样品和对照的 OD 值。

8 试验有效性原则

只有在阳性对照孔所得的平均值(PCX)减去阴性对照孔所得的平均值(NCX)大于 0.15,且阴性对照孔所得的平均值应小于 0.2 时,测定结果才有效。

9 结果计算和判定

9.1 结果计算

按式(1)、式(2)、式(3)计算结果。

$$NCX = \frac{OD_{A1} + OD_{B1}}{2} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

NCX——阴性对照血清孔 OD 值的平均值;

OD_{A1} ——A1 孔阴性对照血清的 OD 值;

OD_{B1} ——B1 孔阴性对照血清的 OD 值。

$$PCX = \frac{OD_{A2} + OD_{B2}}{2} \dots\dots\dots(2)$$

式中:

PCX——阳性对照血清孔 OD 值的平均值;

OD_{A2}——A2 孔阳性对照血清的 OD 值;

OD_{B2}——B2 孔阳性对照血清的 OD 值。

$$S/P = \frac{OD_s - NCX}{PCX - NCX} \dots\dots\dots(3)$$

式中:

OD_s——样品孔的 OD 值。

9.2 结果判定

如果 S/P 值小于 0.20,样品判为牛病毒性腹泻-粘膜病阴性。

如果 S/P 值介于 0.20 和 0.30 之间,样品判为牛病毒性腹泻-粘膜病可疑,应重新检测;重新检测仍为可疑则判为阳性。

如果 S/P 值大于等于 0.30,样品判为牛病毒性腹泻-粘膜病阳性。



SN/T 1999-2007

书号:155066·2-18459

定价: 6.00 元