

ICS 11.220

B 41

备案号:

DB42

湖北省地方标准

DB42/T 793—2012

口蹄疫病毒非结构蛋白抗体酶联免疫吸附 试验检测方法

Enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibody against nonstructure protein
of foot-and-mouth disease virus

地方标准信息服务平台

2012 - 01 - 06 发布

2012 - 03 - 01 实施

湖北省质量技术监督局

发布

目 次

前言.....	II
引言.....	III
1 范围.....	1
2 缩略词.....	1
3 实验原理.....	1
4 实验条件.....	1
5 实验材料.....	2
6 实验方法.....	2
7 结果判定.....	3
8 注意事项.....	3
附录 A.....	4
附录 B.....	6

地方标准信息服务平台

前 言

本标准按 GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》给出的规则起草。

本标准由华中农业大学提出。

本标准由湖北省农业厅归口。

本标准起草单位：华中农业大学动物医学院、武汉科前动物生物制品有限责任公司、湖北省动物疫病预防控制中心。

本标准主要起草人：吴斌、金梅林、钱平、曹胜波、陈焕春、卢顺、李淑云、宋念华。

地方标准信息服务平台

引 言

口蹄疫(Foot-and-mouth disease, FMD)是偶蹄动物的一种急性、高度接触性传染病,其病原是口蹄疫病毒。该病传播途径多,传染性强,发病率高,曾多次在世界上发生过大流行。世界动物卫生组织(OIE)将本病列为必报传染病之首,我国将其列为一类动物疫病。

本标准的检测技术参考 OIE《诊断试验和疫苗标准手册》(2009 版) 2.1.5 章中推荐的方法,并结合起草单位在口蹄疫血清学诊断技术方面的研究基础编写制定。

本文件的发布机构提请注意,声明符合本文件时,可能涉及到《一种口蹄疫病毒非结构蛋白基因 3ABC 及其制备方法与应用》(专利号: ZL2003101001145)相关的专利的使用。

本文件的发布机构对于该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利持有人已向本文件的发布机构保证,他愿意同任何申请人在合理且无歧视的条款和条件下,就专利授权许可进行谈判。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案。相关信息可以通过以下联系方式获得:

专利持有人姓名: 陈焕春、顾贫、曹胜波、钱平、唐勇、金梅林、吴斌、方六荣、刘正飞、吕建强。

地 址: 武汉市洪山区狮子山街 1 号华中农业大学

邮政编码: 430070

联系电话: 027-87282608

传 真: 027-87282608

请注意除上述专利外,本文件的某些内容仍可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

地方标准信息服务平台

口蹄疫病毒非结构蛋白抗体酶联免疫吸附试验检测方法

1 范围

本标准规定了口蹄疫病毒非结构蛋白抗体酶联免疫吸附试验检测方法的缩略词、实验原理、实验条件、实验材料、实验方法、结果判定和注意事项等。

本标准适用于检测猪血清中口蹄疫病毒非结构蛋白的抗体。

2 缩略词

下列缩略词适用于本标准。

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) : 酶联免疫吸附试验

FMDV(foot-and-mouth disease virus) : 口蹄疫病毒

OD_{630nm}值: 630纳米波长处的吸光值

S: 样品孔 OD_{630nm} 值

P: 阳性对照孔 OD_{630nm} 平均值

3 实验原理

口蹄疫感染动物体内产生口蹄疫病毒结构蛋白抗体和非结构蛋白抗体,而口蹄疫疫苗免疫动物主要产生结构蛋白抗体,因此可以通过检测非结构蛋白的抗体来区分疫苗免疫动物和野毒感染动物。在FMDV各蛋白的抗体中,非结构蛋白的抗体是检测FMDV感染的最可靠指标。

FMDV非结构蛋白抗体ELISA检测技术是利用待检样品中的抗体与包被在酶标板上的重组非结构蛋白抗原发生反应,然后通过洗涤把抗原抗体复合物和其他物质分开;再加入酶标记抗体(酶标二抗),酶标记抗体也可以通过反应与抗原抗体复合物结合,此时酶标板上的酶量与样品中的抗体量成正比;加入底物后,底物被酶催化成有色产物,有色产物的量与样品中抗体的量直接相关,故可根据OD_{630nm}值进行分析。

4 实验条件

4.1 实验室

实验操作宜在常温(18℃~25℃)进行。

4.2 仪器

台式低温高速离心机、微量移液器、冰箱、恒温箱、酶标检测仪。

4.3 人员

注意个人防护和环境保护。

5 实验材料

口蹄疫病毒重组非结构蛋白、酶标记抗体、阳性对照血清、阴性对照血清；包被液、封闭液、样品稀释液、洗涤液、底物液 A、底物液 B、终止液；试剂配方见附录 A。

6 实验方法

6.1 样品处理

取猪血液，待血液凝固后，4000 r/min离心10 min，收集血清。血清宜清亮，无严重溶血。具体血液采集与样品处理的注意事项见附录B。

6.2 包被

用包被液将抗原稀释到工作浓度（3.1 μg/mL）加入酶标板孔内，每孔 100 μL，在 2℃~8℃下包被 14 h。

6.3 封闭

取出抗原包被板，弃去孔中的包被液，拍干；每孔加洗涤液200 μL，静置3 min；弃去洗涤液，加封闭液，200 μL/孔，于37℃封闭2 h；弃去封闭液，拍干。于2℃~8℃冷藏过夜，自然干燥。

6.4 样品稀释

用血清稀释液按1:40的比例稀释血清样品（195 μL样品稀释液中加5 μL血清样品），用血清稀释液按1:4的比例稀释对照血清（180 μL样品稀释液中加60 μL对照血清），轻轻振荡混匀。

6.5 加样

将稀释好的待检血清和对照血清各取100 μL加入到抗原包被板孔中，待检血清作1孔，阴性对照和阳性对照各作2孔，轻轻振荡孔中样品（勿溢出），置37℃下温育30 min。

6.6 洗涤

弃掉板孔中的溶液，用洗涤液洗板5次，200 μL/孔，每次静置3 min后倒掉液体，并在干净的吸水纸上拍干。

6.7 加酶标记抗体

每孔加酶标记抗体100 μL，置37℃下温育30 min，按6.6中方法洗板5次。

6.8 加底物

每孔加底物液A、底物液B各50 μL，轻轻振荡混匀，室温（18℃~25℃）避光显色10 min。

6.9 终止反应

每孔加终止液50 μL，轻轻振荡混匀，10 min内测定结果。

6.10 测定吸光值

在酶标仪上于630 nm波长处测各孔OD_{630nm}值。

7 结果判定

试验成立的条件：阳性对照孔 OD_{630nm} 值均 ≥ 0.8 ；阴性对照孔 OD_{630nm} 值均 < 0.3 。
如果 $S \geq 0.3$ ，判为阳性；如果 $S < 0.3$ ，判为阴性。

8 注意事项

实验过程中注意做好个人的生物安全防护措施，废弃物应做无害化处理。

地方标准信息服务平台

附 录 A
(规范性附录)
试剂的配置

A.1 洗涤液

氯化钠 (NaCl)	8.0 g
氯化钾 (KCl)	0.2 g
磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)	2.9 g
磷酸二氢钠 (NaH ₂ PO ₄)	0.2 g
吐温-20 (Tween-20)	0.5 mL
加蒸馏水至	1000 mL

置2℃~8℃下保存备用。

A.2 样品稀释液

牛血清白蛋白 (BSA)	0.5 g
加洗涤液至	100 mL

置2℃~8℃下保存备用。

A.3 酶标记抗体

用样品稀释液按1:5000稀释，置4℃保存可使用7d。

A.4 底物液A的配制

磷酸氢二钠 (Na ₂ HPO ₄)	14.6 g
柠檬酸 (C ₆ H ₈ O ₇)	9.33 g
过氧化脲 (CH ₆ N ₂ O ₃)	0.52 g
加蒸馏水至	1000 mL

用HCl调pH值至5.0~5.4，置2℃~8℃下保存备用。

A.5 底物液B的配制

四甲基联苯胺 (TMB)	20 mg
无水乙醇 (C ₂ H ₆ O)	10 mL
加蒸馏水至	1000 mL

置2℃~8℃下避光保存备用。

A.6 终止液

40%的氢氟酸 (HF)	625 μL
加蒸馏水至	100 mL

置2℃~8℃下保存备用。

A.7 包被液

碳酸钠 (Na_2CO_3)	1.59 g
碳酸氢钠(NaHCO_3)	2.93 g
加蒸馏水至	1000 mL
置2℃~8℃下保存备用。	

A.8 封闭液

牛血清白蛋白 (BSA)	0.5 g
蔗糖 ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$)	1 g
加洗涤液至	100 mL
置2℃~8℃下保存备用。	

地方标准信息服务平台

附 录 B
(资料性附录)
采样与样品处理注意事项

- B.1 血样的采集和处理，应进行无菌操作，防止样本因污染发生变质。存放血样的容器应无菌，可使用一次性灭菌容器。
- B.2 血液自然凝固后无菌分离血清装入灭菌离心管或小瓶中，加盖密封后置 2℃~8℃ 下冷藏保存。每份血清样品贴标签并写明编号、采集地点、免疫背景、时间等，以便通过抗体检测，做出追溯性诊断。
- B.3 采样及实验过程中，应穿工作服、戴口罩和一次性手套。
-

地方标准信息服务平台