

ICS 11.220

B 41

备案号:

DB42

湖北省地方标准

DB42/T 788—2012

猪流感病毒(H1 亚型)酶联免疫吸附试验抗体检测方法

Method of the Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against swine influenza virus (subtype H1)

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.....	1
6 实验方法.....	2
7 结果判定.....	3
8 注意事项.....	3
附录 A.....	4

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：金梅林、郭学波、杨影、陈焕春、徐高原、钟广汉、宋念华、田峰、董晓辉、孙小美、李淑云。

地方标准信息服务平台

引 言

猪流感病毒(Swine Influenza Virus, SIV)属正粘病毒科,可引起猪流行性感冒(Swine Influenza, SI)。在猪群中广泛流行的 SIV 主要是古典型 H1N1 和类禽型 H1N1,可引起猪咳嗽、呼吸困难、发热和衰竭等症状易暴发流行。由于 SIV 对呼吸道上皮的高度特异亲嗜性而使呼吸道管壁上皮受损,导致猪链球菌、胸膜肺炎放线杆菌、副猪嗜血杆菌、巴氏杆菌等细菌和猪呼吸道冠状病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒等的继发或混合感染,使病情更为复杂。为开展猪流感的免疫监测,了解猪群猪流感病毒抗体水平,指导猪流感免疫预防工作,特制定本标准。

地方标准信息服务平台

猪流感病毒(H1 亚型)酶联免疫吸附试验抗体检测方法

1 范围

本标准规定了猪流感病毒(H1 亚型) 酶联免疫吸附试验抗体检测方法的缩略词、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。

本标准适用于猪血清中的流感病毒抗体的检测。

2 缩略词

下列缩略词适用于本文件。

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

OD_{630nm} 值: 630 纳米波长处的吸光值

HRP: 辣根过氧化物酶

HI 法: 血凝抑制试验法

S: 样品孔 OD_{630nm} 值

P: 阳性对照孔 OD_{630nm} 平均值

3 实验原理

应用酶联免疫原理制成检测猪流感病毒(H1 亚型) 抗体的间接 ELISA 方法。利用抗原抗体反应的特异性, 将特异性的猪流感病毒(H1 亚型) 抗原吸附到固相载体的表面后, 待检物中若含有相应的抗体, 则可与所包被的抗原相结合, 并能进一步和酶标记抗体结合形成复合物。在遇到相应的底物时, 复合物中的酶能催化底物发生显色反应。其显色的深浅与相应的抗体量成正相关, 可借助 OD_{630nm} 值的大小进行定性判断。

4 实验条件

4.1 实验室

实验操作宜在常温(18 °C~25 °C) 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、酶标仪。

4.3 人员

注意个人防护和环境保护。

5 实验材料

- 5.1 猪流感病毒（H1 亚型）抗原（见附录 A.8）。
- 5.2 酶标板：96 孔板，可拆。
- 5.3 酶标记抗体（见附录 A.9）。
- 5.4 阳性对照血清（见附录 A.10）。
- 5.5 阴性对照血清（见附录 A.11）。
- 5.6 其它试剂
包被液、封闭液、洗涤液、样品稀释液、底物液 A、底物液 B、终止液。试剂配方及要求见附录 A。

6 实验方法

6.1 样品采集

将采集的猪全血静置 30 min，收集上清备用。

6.2 抗原包被板制备

取猪流感病毒（H1 亚型）抗原用包被液稀释到工作浓度（2.5 μg/mL），加入酶标板，100 μL/孔，37 °C 孵育 2 h。弃去孔中液体，拍干。加入封闭液，200 μL/孔，于 37 °C 封闭 2 h，取出酶标板弃去孔中液体在吸水纸上拍干，于 2 °C~8 °C 保存，可保存 7 d。

6.3 样品稀释

在血清稀释板中按 1:40 的比例稀释样品（例如：195 μL 样品稀释液中加入 5 μL 样品，即为 1:40 稀释）。稀释好的样品可在 2 °C~8 °C 保存 7 d。

6.4 加样

取出抗原包被板（根据样品多少，可拆开分次使用），先用洗涤液洗板 1 次，再将稀释好的样品加入抗原包被板，100 μL/孔。同时设 2 孔阴性对照、2 孔阳性对照及 1 孔空白对照，轻轻振匀孔中样品（勿溢出），置 37 °C 下孵育 30 min。

6.5 洗涤

取出抗原包被板弃去孔中液体，在吸水纸上拍干，用洗涤液洗板 3 次，200 μL/孔。每次静置 3 min 后倒掉液体，在吸水纸上拍干。

6.6 加酶标记抗体

取酶标记抗体用样品稀释液稀释到工作浓度，加入酶标板，100 μL/孔，37 °C 孵育 30 min。按 6.5 中方法洗板 3 次。

6.7 加底物液

每孔加底物液 A 和底物液 B 各 50 μL，混匀，置室温下（18 °C~25 °C）避光显色 10 min。

6.8 加终止液

每孔加终止液 50 μL，轻轻振荡混匀。

6.9 测定结果

以空白对照孔调零,用酶标仪测定各孔的 OD_{630nm} 值。测定结果必须在加入终止液后 10 min 内完成。

7 结果判定

7.1 试验成立的条件是两个阳性对照孔的 OD_{630nm} 值相差应 <0.3 ; 两个阳性对照孔 OD_{630nm} 值均应 ≥ 0.8 , 且 <1.6 。两个阴性对照孔 OD_{630nm} 值均应 <0.2 。

7.2 如果 $S \geq 0.3$, 判为阳性; 如果 $S < 0.3$, 则判为阴性。

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)
试剂的配制

A.1 包被液的配制

碳酸钠 (Na_2CO_3)	1.59 g
碳酸氢钠 (NaHCO_3)	2.93 g

加蒸馏水或去离子水定容至 1000 mL 即可, 置 $2\text{ }^\circ\text{C}\sim 8\text{ }^\circ\text{C}$ 下保存。

A.2 封闭液的配制

5 g 牛血清白蛋白 (BSA) 溶于 1000 mL 洗涤液。置 $2\text{ }^\circ\text{C}\sim 8\text{ }^\circ\text{C}$ 下保存。

A.3 洗涤液的配制

氯化钠 (NaCl)	8 g
氯化钾 (KCl)	0.2 g
磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2.9 g
磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)	0.2 g
Tween-20	0.5 mL

加蒸馏水或去离子水定容至 1000 mL 即可。置 $2\text{ }^\circ\text{C}\sim 8\text{ }^\circ\text{C}$ 下保存。

A.4 样品稀释液的配制

牛血清白蛋白 (BSA)	5.0 g
二甲基亚砷 (DMSO)	10 mL

加洗涤液定容至 1000 mL。置 $2\text{ }^\circ\text{C}\sim 8\text{ }^\circ\text{C}$ 下保存。

A.5 底物液A的配制

磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4)	14.6 g
柠檬酸 ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)	9.33 g
过氧化脲 ($\text{CH}_6\text{N}_2\text{O}_3$)	0.52 g

加蒸馏水至 1000 mL
用盐酸调pH值至5.0~5.4, 置 $2\text{ }^\circ\text{C}\sim 8\text{ }^\circ\text{C}$ 下保存。

A.6 底物液B的配制

四甲基联苯胺 (TMB)	20 mg
无水乙醇 ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$)	10 mL

加蒸馏水至 1000 mL
置2℃~8℃下避光保存。

A.7 终止液的配制

40%的氢氟酸 (HF) 625 μL
加蒸馏水至 100 mL
置2℃~8℃下保存。

A.8 猪流感病毒 (H1 亚型) 抗原

猪流感病毒 (H1 亚型) 抗原由基因工程技术表达获得。-20℃下保存备用。

A.9 酶标记抗体

酶标记抗体由羊抗猪 IgG 经 HRP 标记获得。2℃~8℃下保存备用。

A.10 阳性对照血清

通过筛选猪流感病毒 (H1 亚型) 抗体阳性猪获得, 效价应大于 $7 \log_2$ (HI 法)。2℃~8℃下保存备用。

A.11 阴性对照血清

通过筛选猪流感病毒 (H1 亚型) 抗体阴性猪获得, 效价应小于 $2 \log_2$ (HI 法)。2℃~8℃下保存备用。

地方标准信息服务平台