

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 678—2003

猪伪狂犬病免疫酶试验方法

Enzyme immunoassay for porcine pseudorabies

2003-07-30 发布

2003-10-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准的附录 A 是规范性附录。

本标准由农业部畜牧兽医局提出并归口。

本标准起草单位：农业部兽医诊断中心。

本标准主要起草人：王宏伟、吴清民、童光志、田克恭、陈西钊、苏敬良、王传彬。

猪伪狂犬病免疫酶试验方法

1 范围

本标准规定了猪伪狂犬病 E 糖蛋白(gE, 即 gp I) 酶联免疫吸附试验和免疫酶组织化学试验方法。本标准适用于检测猪血清中的猪伪狂犬病病毒 gE 特异性抗体和组织中的猪伪狂犬病病毒抗原。

2 E 糖蛋白酶联免疫吸附试验(gE-ELISA)

2.1 材料准备

2.1.1 试剂

- a) ELISA 抗原包被板;
- b) 标准阳性血清: 伪狂犬病病毒 gE 单克隆抗体;
- c) 标准阴性血清: 无伪狂犬病病毒 gE 抗体的猪血清;
- d) 酶结合物: 辣根过氧化物酶(HRP) 标记的抗伪狂犬病病毒 gE 单克隆抗体;
- e) 磷酸盐缓冲液(PBS): 配制见第 A.1 章;
- f) 洗涤液: 配制见第 A.2 章;
- g) 样品稀释液: 配制见第 A.3 章;
- h) 底物溶液: 配制见第 A.5 章;
- i) 终止液: 配制见第 A.6 章。

2.1.2 器材

- a) 酶联检测仪;
- b) 微量加样器, 容量 50 μL ~200 μL ;
- c) 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱。

2.1.3 样品

采集被检猪血液, 分离血清, 血清应新鲜、透明、不溶血、无污染, 密装于灭菌小瓶内, 4 $^{\circ}\text{C}$ 或 -30 $^{\circ}\text{C}$ 保存或立即送检。试验前将被检血清统一编号, 并用样品稀释液作 2 倍稀释。

2.2 操作方法

2.2.1 取出包被板, 并将样品位置准确记录在记录单上。

2.2.2 向 A₁、A₂、A₃ 孔中分别加入 100 μL 未经稀释的阴性对照血清, A₄、A₅、A₆ 孔中分别加入 100 μL 未经稀释的阳性对照血清, 其他各孔加入 100 μL 稀释好的待检样品。

2.2.3 置室温 1 h。

2.2.4 弃去孔内液体, 再在纱布或吸水纸上拍干。

2.2.5 用洗涤液将反应板洗涤(3~5)次, 每次洗涤后均弃去孔内液体。最后一次洗涤后, 除净孔内液体, 拍干。

2.2.6 每孔加入 100 μL 酶结合物溶液, 室温下作用 20 min。

2.2.7 重复 2.2.4 和 2.2.5。

2.2.8 各孔加入 100 μL 底物液。

2.2.9 室温放置 15 min。

2.2.10 各孔加入 50 μL 终止液, 立即用酶标仪于 650 nm 测定各孔吸光度(OD)值。

2.3 结果判定

2.3.1 只有在阴性对照 OD 值的均值减去阳性对照 OD 值的均值大于等于 0.3 时, 试验成立。