

# 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  $\mu\text{L}$ ~200  $\mu\text{L}$ ;
- 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 A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub> 孔中分别加入 100  $\mu\text{L}$  未经稀释的阴性对照血清, A<sub>4</sub>、A<sub>5</sub>、A<sub>6</sub> 孔中分别加入 100  $\mu\text{L}$  未经稀释的阳性对照血清, 其他各孔加入 100  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  底物液。

2.2.9 室温放置 15 min。

2.2.10 各孔加入 50  $\mu\text{L}$  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。

2.3.2 待检样品是否含有针对 gE 抗原的抗体取决于每个样品的 S/N 值, S/N 等于样品 OD 值除以阴性对照 OD 均值。

2.3.2.1 如果样品的 S/N 值小于等于 0.6, 表明血清中含伪狂犬病病毒 gE 抗体。

2.3.2.2 如果 S/N 值大于 0.6、小于等于 0.7, 应重新检测样品。如仍得到相同的结果, 三周后应重新采样检测。

2.3.2.3 如果 S/N 值大于 0.7, 表明血清中无 gE 抗体。

### 3 免疫酶组织化学法

#### 3.1 材料准备

##### 3.1.1 试剂

- a) 磷酸盐缓冲液(PBS): 配制见第 A.1 章;
- b) 标准阳性血清: 伪狂犬病病毒实验感染猪制备的血清;
- c) 标准阴性血清: 无伪狂犬病病毒感染、未经免疫的猪血清;
- d) 酶结合物: HRP 标记的 SPA;
- e) 底物溶液: 配制见第 A.7 章;
- f) 过氧化氢甲醇溶液: 配制见第 A.8 章;
- g) 盐酸酒精溶液: 配制见第 A.9 章;
- h) 胰蛋白酶溶液: 配制见第 A.10 章。

##### 3.1.2 器材

- a) 普通光学显微镜;
- b) 微量加样器, 容量 50  $\mu\text{L}$ ~200  $\mu\text{L}$ ;
- c) 石蜡切片机或冷冻切片机;
- d) 载玻片及盖玻片;
- e) 37 $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱或水浴箱。

##### 3.1.3 样品

对疑似伪狂犬病的病死猪或扑杀猪, 立即采集肺、扁桃体和脑等组织数小块, 置冰瓶内立即送检。不能立即送检者, 将组织块切成 1 cm $\times$ 1 cm 左右大小, 置体积分数为 10% 的福尔马林溶液中固定, 保存, 送检。

#### 3.2 操作方法

3.2.1 新鲜组织按常规方法制备冰冻切片。冰冻切片风干后用丙酮固定 10 min~15 min; 新鲜组织或固定组织按常规方法制备石蜡切片, 常规脱蜡至 PBS(切片应用白胶或铬矾明胶做粘合剂, 以防脱片)。

3.2.2 去内源酶: 用过氧化氢甲醇溶液或盐酸酒精溶液 37 $^{\circ}\text{C}$  作用 20 min。

3.2.3 胰蛋白酶消化: 室温下, 用胰蛋白酶溶液消化处理 2 min, 以便充分暴露抗原。

3.2.4 漂洗: PBS 漂洗三次, 每次 5 min。

3.2.5 封闭: 滴加体积分数为 5% 的新生牛血清或 1:10 稀释的正常马血清, 37 $^{\circ}\text{C}$  湿盒中作用 30 min。

3.2.6 加适当稀释的标准阳性血清或标准阴性血清, 37 $^{\circ}\text{C}$  湿盒中作用 1 h 或 37 $^{\circ}\text{C}$  湿盒中作用 30 min 后 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜。

3.2.7 漂洗同 3.2.4。

3.2.8 加适当稀释的酶结合物, 37 $^{\circ}\text{C}$  湿盒作用 1 h。

3.2.9 漂洗同 3.2.4。

3.2.10 底物显色: 新鲜配制的底物溶液显色 5 min~10 min 后漂洗。

3.2.11 衬染: 苏木素或甲基绿衬染细胞核或细胞质。

3.2.12 从 90% 乙醇开始脱水、透明、封片, 普通光学显微镜观察。

3.2.13 试验同时设阳性对照和阴性对照。

### 3.3 结果判定

阳性和阴性对照片本底清晰,背景无非特异着染,阳性对照组织细胞胞核呈黄色至棕褐色着染,试验成立;被检组织细胞胞核、偶见胞浆呈黄色至棕褐色着染,即可判为伪狂犬病病毒抗原阳性。

**附 录 A**  
**(规范性附录)**  
**试 剂 的 配 制**

**A. 1 磷酸盐缓冲液(PBS, 0.01 mol/L pH7.4)**

氯化钠	8 g
氯化钾	0.2 g
磷酸二氢钾	0.2 g
十二水磷酸氢二钠	2.83 g
蒸馏水	加至 1 000 mL

**A. 2 洗涤液**

PBS	1 000 mL
吐温-20	0.5 mL

**A. 3 样品稀释液**

含体积分数为 10% 新生牛血清的洗涤液。

**A. 4 磷酸盐-柠檬酸缓冲液(pH5.0)**

柠檬酸	3.26 g
十二水磷酸氢二钠	12.9 g
蒸馏水	700 mL

**A. 5 gE-ELISA 底物溶液**

用二甲基亚砜将 3'3'5'5'-四甲基联苯胺(TMB)配成 1% 质量浓度, 4℃ 保存。使用时按下列配方配制底物溶液。

磷酸盐-柠檬酸缓冲液	9.9 mL
1% 3'3'5'5'-四甲基联苯胺	0.1 mL
30% 双氧水	1 μL

**A. 6 终止液**

氢氟酸	0.31 mL
蒸馏水	100 mL

**A. 7 免疫组织化学底物溶液**

3,3-二胺基联苯胺盐酸盐(DAB)	40 mg
PBS	100 mL
丙酮	5 mL

30%过氧化氢 0.1 mL

滤纸过滤后使用,现用现配。

**A. 8 过氧化氢甲醇溶液(0.3%)**

30%过氧化氢 1 mL

甲醇 99 mL

现用现配。

**A. 9 盐酸酒精溶液(1%)**

盐酸 1 mL

70%乙醇 99 mL

**A. 10 胰蛋白酶溶液(0.5%)**

胰蛋白酶 0.5 g

PBS 100 mL

低温保存。使用时,用 PBS 稀释为 0.05%。

---