

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 679—2003

猪繁殖与呼吸综合症免疫酶试验方法

Enzyme immunoassay for porcine reproductive and respiratory syndrome

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 为规范性附录。

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、王传彬、陈西钊、田克恭。

猪繁殖与呼吸综合症免疫酶试验方法

1 范围

本标准规定了猪繁殖与呼吸综合症(PRRS)免疫酶试验和免疫酶组织化学方法。

本标准适用于检测猪血清中的猪繁殖与呼吸综合症病毒(PRRSV)抗体和组织中的 PRRSV 抗原。

2 免疫酶试验

2.1 材料准备

2.1.1 试剂

2.1.1.1 磷酸盐缓冲液(PBS):配制见第 A.1 章。

2.1.1.2 抗原涂片的制备:PRRSV 接种于生长至 70%~80%单层的 Marc-145 细胞。接种后 3 d~4 d,病变达 50%~75%时,用胰蛋白酶消化分散感染的细胞单层,PBS 洗涤三次后,稀释至 1×10^6 个细胞/mL。取印有 10 个~40 个小孔的室玻片,每孔滴加 10 μ L。室温自然干燥后,冷丙酮(4 $^{\circ}$ C)固定 10 min。密封包装,置-20 $^{\circ}$ C 备用。

2.1.1.3 标准阳性血清:PRRSV 试验感染猪制备的血清。

2.1.1.4 标准阴性血清:无 PRRSV 感染、未经免疫的猪血清。

2.1.1.5 酶结合物:辣根过氧化物酶(HRP)标记的葡萄球菌 A 蛋白(SPA)。

2.1.1.6 底物溶液:配制见第 A.2 章。

2.1.2 器材

- a) 普通光学显微镜;
- b) 印有 10 个~40 个小孔的室玻片;
- c) 微量加样器,容量 5 μ L~50 μ L;
- d) 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱或水浴箱。

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 $^{\circ}$ C 或-30 $^{\circ}$ C 保存或立即送检。试验前将被检血清统一编号,并用 PBS 作 10 倍稀释。

2.2 操作方法

2.2.1 取出抗原涂片,室温干燥后,滴加 10 倍稀释的待检血清和标准阴性血清、标准阳性血清,每份血清加两个病毒细胞孔和一个正常细胞孔,置湿盒内,37 $^{\circ}$ C 30 min。

2.2.2 PBS 漂洗三次,每次 5 min,室温干燥。

2.2.3 滴加适当稀释的酶结合物,置湿盒内,37 $^{\circ}$ C 30 min。

2.2.4 PBS 漂洗三次,每次 5 min。

2.2.5 将室玻片放入底物溶液中,室温下显色 5 min~10 min。PBS 漂洗两次,再用蒸馏水漂洗一次。

2.2.6 吹干后,在普通光学显微镜下观察,判定结果。

2.3 结果判定

2.3.1 在阴性血清对照、阳性血清对照成立的情况下:即阴性血清与正常细胞和病毒感染细胞反应均无色;阳性血清与正常细胞反应无色,与病毒感染细胞反应呈棕黄色至棕褐色,即可判定结果;否则应重试。

2.3.2 待检血清与正常细胞和病毒感染细胞反应均呈无色,即可判为 PRRSV 抗体阴性。

2.3.3 待检血清与正常细胞反应呈无色,而与病毒感染细胞反应呈棕黄色至棕褐色,即可判为

PRRSV 抗体阳性。

3 免疫酶组织化学法

3.1 材料准备

3.1.1 试剂

- 3.1.1.1 磷酸盐缓冲液(PBS):配制见第 A.1 章。
- 3.1.1.2 标准阳性血清:PRRSV 实验感染猪制备的血清。
- 3.1.1.3 标准阴性血清:无 PRRSV 感染、未经免疫的猪血清。
- 3.1.1.4 酶结合物:HRP 标记的 SPA。
- 3.1.1.5 底物溶液:配制见第 A.2 章。
- 3.1.1.6 过氧化氢甲醇溶液:配制见第 A.3 章。
- 3.1.1.7 盐酸酒精溶液:配制见第 A.4 章。
- 3.1.1.8 胰蛋白酶溶液:配制见第 A.5 章。

3.1.2 器材

- a) 普通光学显微镜;
- b) 微量加样器,容量 50 μL ~200 μL ;
- 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 PRRS 的病死猪或扑杀猪,立即采集肺、扁桃体和脾等组织数小块,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 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浆呈黄色至棕褐色着染,试验成立;被检组织细胞胞浆、偶见胞核呈黄色至棕褐色着染,即可判为 PRRSV 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 底物溶液

| | |
|--------------------|--------|
| 3,3-二氨基联苯胺盐酸盐(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.3 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.4 盐酸酒精溶液(1%)

| | |
|-------|-------|
| 盐酸 | 1 mL |
| 70%乙醇 | 99 mL |

A.5 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%。
