

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1873—2010

**日本脑炎病毒抗体间接检测
酶联免疫吸附法**

Indirect ELISA for antibody detection of Japanese encephalitis virus

2010-05-20 发布

2010-09-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：中国动物卫生与流行病学中心。

本标准主要起草人：陈义平。

日本脑炎病毒抗体间接检测 酶联免疫吸附法

1 范围

本标准规定了日本脑炎病毒抗体的间接 ELISA 检测技术操作程序。

本标准适用于进出口检疫及流行病学调查时对猪血清中日本脑炎病毒抗体的检测。

2 间接 ELISA

2.1 材料准备

2.1.1 器材

37℃ 恒温培养箱、微量移液器、震荡混匀仪、酶标仪、酶标板等。

2.1.2 包被抗原

包被用抗原为日本脑炎病毒囊膜蛋白结构域Ⅲ重组蛋白(re-DⅢ),经大肠杆菌表达后亲和层析纯化而成。每孔包被量为 100 ng。

2.1.3 阴性对照血清

SPF 猪血清,经 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液(附录 A)1:40 稀释后作为阴性对照血清。

2.1.4 阳性对照血清

日本脑炎病毒疫苗免疫健康猪,抗体中和效价达到 1:640 时采血分离血清,将中和效价为 1:640 的阳性血清用 pH7.4 的磷酸盐缓冲液(附录 A)作 1:160 稀释,即为阳性对照血清。

2.1.5 包被液、洗涤液、封闭液、酶标抗体稀释液、底物液、终止液

配制方法见附录 A。

2.1.6 检测前,先将各种试剂材料平衡至室温。

2.2 操作方法

2.2.1 抗原包被

以 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液稀释抗原(将 re-DⅢ重组抗原稀释至 1 μg/mL),按每孔 100 μL 包被酶标板,37℃ 作用 2 h 后,洗涤液(PBST)洗板 3 次,每次 5 min。

2.2.2 封闭

每孔加入 200 μL 封闭液,37℃ 封闭 2 h,洗板同上。

2.2.3 加待检血清及对照血清

以 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液作为样本稀释液,将待检血清按 1:40 稀释后 100 μL/孔加样,每板同时设置两孔阴性血清对照、两孔阳性血清对照,并设一孔空白对照。37℃ 作用 1 h,洗板同上。

2.2.4 加酶标抗体

每孔加入工作浓度的 100 μL 兔抗猪酶标抗体,37℃ 作用 1 h,洗板同上。

2.2.5 加底物液

每孔加入底物液 100 μL,37℃ 显色作用 10 min。

2.2.6 加终止液

每孔加入 100 μL 终止液终止反应,15 min 之内测定 OD₄₅₀ 值。

2.2.7 结果判定

在酶标仪上读出 OD₄₅₀ 的值。以空白值调零,计算阳性对照 OD₄₅₀ 平均值、阴性对照 OD₄₅₀ 平均值。

NY/T 1873—2010

阴性对照 OD₄₅₀ 平均值 ≤ 0.2 时试验成立。此时, 样品 OD₄₅₀ 值与阳性对照 OD₄₅₀ 平均值比值 ≥ 0.35 判为阳性; 样品 OD₄₅₀ 值与阳性对照 OD₄₅₀ 平均值比值 < 0.35 判为阴性。

附录 A
(资料性附录)
溶液的配制

A.1 包被液(碳酸盐缓冲液,pH 9.6)

| | |
|---------------------------------------|--------|
| NaHCO ₃ (分析纯) | 2.98 g |
| Na ₂ CO ₃ (分析纯) | 1.5g |
| 定容至 1 000 mL,混匀。 | |

A.2 洗涤液(PBST,pH 7.4)

| | |
|---|--------|
| NaCl(分析纯) | 8.0 g |
| KH ₂ PO ₄ (分析纯) | 0.2 g |
| Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O(分析纯) | 2.9 g |
| KCl(分析纯) | 0.2 g |
| Tween20(分析纯) | 0.5 mL |
| 硫柳汞(分析纯) | 0.1 g |
| 加双蒸水至 1 000 mL,调至 pH7.4。 | |

A.3 封闭液(1%BSA/PBST 溶液,pH 7.4)

BSA(生物技术级)5 g,加 PBST 至 500 mL。

A.4 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)

| | |
|---|-------|
| NaCl(分析纯) | 8.0 g |
| KH ₂ PO ₄ (分析纯) | 0.2 g |
| Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O(分析纯) | 2.9 g |
| KCl(分析纯) | 0.2 g |
| 硫柳汞(分析纯) | 0.1 g |
| 加双蒸水至 1 000 mL,调至 pH7.4。 | |

A.5 酶标抗体稀释液

将小牛血清 10 mL 加入到 90 mL PBST 中,混匀。

A.6 底物缓冲液(TMB-过氧化氢脲溶液)**A.6.1 底物缓冲液 A**

TMB(生物技术级)200 g,无水乙醇(或 DMSO)100 mL,加双蒸水至 1 000 mL。

A.6.2 底物缓冲液 B(0.1 mol/L 柠檬酸-0.2 mol/L Na₂HPO₄缓冲液,pH 5.0~5.4)

Na₂HPO₄ 14.60 g,柠檬酸 9.33 g,0.75%过氧化氢尿素 6.4 mL,加双蒸水至 1 000 mL,调至 pH 5.0~5.4。

A.6.3 将底物缓冲液 A 和底物缓冲液 B 按 1:1 混合即成底物缓冲液。

A.7 底物液

TMB 1 mg, 1% H_2O_2 25 μL , 底物缓冲液 10 mL, 混合即成。

A.8 终止液(2M H_2SO_4)

将 50 mL 浓 H_2SO_4 缓慢滴加入 300 mL 蒸馏水中, 边加边搅拌, 补充蒸馏水至 450 mL。
