



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 21675—2008

## 非洲马瘟诊断技术

Diagnostic techniques for African horse sickness

2008-04-09 发布

2008-06-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局  
中国国家标准化管理委员会

发布

## 前 言

本标准的附录 A、附录 B 为规范性附录。

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：包静月、王淑娟、吴鑑三、王志亮、宋翠平、封启民。

## 引 言

非洲马瘟(African horse sickness, AHS)是马科动物的一种非接触性传染的病毒性传染病。由呼肠孤病毒科环状病毒属的非洲马瘟病毒(AHSV)引起,以呼吸系统和循环系统变化为特征,常使马、骡致死。至少有两种库蠓属节肢动物传播本病。该病有 9 个血清型。《中华人民共和国动物防疫法》将本病列为一类动物疫病,世界动物卫生组织(OIE)列为 A 类传染病。

本标准诊断技术内容包括临床症状、病理变化、病原鉴定和血清学试验。

本标准主要参考 OIE《哺乳动物、禽、蜂 A 和 B 类疾病诊断试验和疫苗标准手册》(2000 年版),并结合我国的研究成果制定的。

# 非洲马瘟诊断技术

## 1 范围

本标准规定了非洲马瘟(AHS)的临床诊断、病原鉴定和血清学试验技术的要求。

本标准适用于马、骡和其他马科动物非洲马瘟的检疫。

## 2 临床症状

### 2.1 最急性型或肺型

症状急性发作,潜伏期 3 d~5 d,特征为严重的渐进性呼吸道症状,初期仅显发热反应,最高体温可达 40℃~41℃,持续 1 d~2 d 就降至常温,之后出现不同程度的呼吸困难,可见前腿分开,头前伸,鼻孔扩大。通常出汗较多,最后可见痉挛性咳嗽,同时从鼻孔流出泡沫样黄色液体。以其自身的浆液性液体而溺死。这种病型康复率不到 5%。

### 2.2 亚急性型或水肿型、心型

病初有发热反应(39℃~41℃)。潜伏期 7 d~14 d。发热持续 3 d~6 d,发热后期,出现特征性水肿。水肿首先出现于颈部、眶上窝和眼睑,以后可扩展至嘴唇、面颊、舌部、下颌骨间、咽喉区,有时皮下水肿从颈部至胸部不等,严重时胸部和肩部也出现水肿。晚期可见结膜和舌腹侧、皮下出血点。最后变得烦躁不安,死于心力衰竭。一般在发热反应后 4 d~8 d 内死亡,死亡率约 50%。康复动物于 3 d~8 d 内水肿逐渐消失。

### 2.3 急性或混合型

肺型和心型混合存在,临床不多见。潜伏期 5 d~7 d。病初肺部有轻微症状,然后头部和颈部出现明显水肿,最后死于心力衰竭。或先出现亚急性型症状,然后突发最急性型典型呼吸困难和其他临床表现。通常发热后 3 d~6 d 死亡,死亡率超过 80%。

### 2.4 最温和型

潜伏期 5 d~14 d,后期表现弛张热(39℃~40℃),持续 5 d~8 d。可能出现结膜轻度出血、脉搏加快、轻微厌食和精神抑郁。其他临床症状不明显。

## 3 病理学诊断

最特征及最常见的病变是皮下和肌肉组织间胶样浸润,并以眶上窝和喉头尤为显著。胃底黏膜肿胀一直延伸到小肠前部。咽、气管、支气管充满黄色浆液和泡沫,肺泡、胸膜下和肺间质水肿,约有 2/3 病例有急性水肿。亚急性病例,头部、颈部和肩部水肿严重。心内膜和心包膜有血点和出血瘀斑、心肌变性。有些病例胸腔和心包积存大量黄白色-红色液体,淋巴结肿大、肝和胃出血。

## 4 实验室诊断

### 4.1 病原分离和鉴定

#### 4.1.1 试剂

4.1.1.1 磷酸盐缓冲液(PBS)(见 B.1.2)。

4.1.1.2 含有青霉素链霉素的磷酸盐缓冲液(PBS)(见 B.1.4)。

4.1.1.3 50%甘油-磷酸盐缓冲液(见 B.1.3)。

4.1.1.4 MEM(最低限度必需氨基酸营养液)完全营养液(见 B.2.2)。

4.1.1.5 MEM 维持液(见 B.2.3)。

#### 4.1.2 样品采集

发热动物取抗凝血,死亡动物取 2 g~4 g 小块脾、肺和淋巴结,保存于 4℃或放入 50%甘油-磷酸盐缓冲液中,4℃运送和保存。用含有青霉素链霉素的磷酸盐缓冲液(PBS)将组织块配成 10%悬液后,供分离。

#### 4.1.3 病毒分离

非洲马瘟病毒(AHSV)可直接以仓鼠肾细胞(BHK-21)、猴稳定细胞(MS)和绿猴肾细胞(VERO)细胞系进行分离。肝素抗凝血液样品勿需稀释就可使用,将样品接种上述细胞,吸附 60 min 后,加入 MEM 维持液。若用脾、肺等组织病料,则需磨碎,以含青霉素链霉素的磷酸盐缓冲液(PBS)或 MEM 完全营养液制成 10%的组织悬浮液。接种后 12 d~18 d 可出现细胞病变效应(CPE),如盲传三代仍无 CPE,则判为阴性。

#### 4.1.4 乳鼠分离

AHSV 可用 2 窝 1 日龄~3 日龄乳鼠通过脑内接种进行分离。阳性病料接种 3 d~15 d 后,乳鼠可出现神经症状。取发病鼠脑,匀浆后,再脑内接种 6 只以上乳鼠。第二次传代的潜伏期应缩短为 2 d~5 d,感染率为 100%。

#### 4.1.5 反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)

以 RT-PCR 法检测 AHSV 的 RNA。

##### 4.1.5.1 器材

PCR 扩增仪,研钵和研杵,无 RNA 酶污染的 1.5 mL 离心管和枪头。

##### 4.1.5.2 试剂

4.1.5.2.1 引物 正向引物 S7P1(5'-GTT AAA ATT CGC TTA GGA TG-3'),反向引物 S7P2(5'-GTA AGT GTC TTC GGT ATT C-3')。

4.1.5.2.2 Trizol

4.1.5.2.3 75%乙醇(见第 B.4 章)。

4.1.5.2.4 二乙基焦磷酸胺(DEPC)处理过的水(见第 B.5 章)。

4.1.5.2.5 一步法 RT-PCR 试剂盒。

4.1.5.2.6 1%的琼脂糖凝胶(见第 B.7 章)。

4.1.5.2.7 0.5×TBE 缓冲液(硼酸-乙二胺四乙酸(EDTA)(TBE)缓冲液(见第 B.6 章)。

4.1.5.2.8 2 倍反应混合液。

4.1.5.2.9 反转录酶和 Taq 酶混合物。

4.1.5.2.10 去上清其他试剂:三氯甲烷(分析纯)、异丙醇(分析纯)。

##### 4.1.5.3 操作方法

4.1.5.3.1 在-70℃预冷的灭菌研钵中加入 1 mL Trizol。

4.1.5.3.2 取 100 mg 病料,用灭菌的剪刀剪碎。用灭菌的镊子夹到加有 Trizol 的研钵中,充分研磨。

4.1.5.3.3 将研磨好的组织匀浆转移到新的离心管中,离心 12 000 r/min,10 min,4℃。

4.1.5.3.4 取上清,静置 5 min。加入 200 μL 三氯甲烷,振荡混匀 15 s,静置 2 min~3 min。离心 12 000 r/min,15 min,4℃。

4.1.5.3.5 取上清到新的离心管中,加等体积的异丙醇,混匀,静置 10 min。离心 12 000 r/min,10 min,4℃。

4.1.5.3.6 去上清,加入 1 mL 75%乙醇,离心 12 000 r/min,5 min,4℃。

4.1.5.3.7 按步骤 4.1.5.3.6 重复离心一次。

4.1.5.3.8 去上清,室温干燥 RNA 5 min。

4.1.5.3.9 加入 100 μL DEPC 处理过的水溶解 RNA。

4.1.5.3.10 每管 RT-PCR 扩增混合液体系的总体积为 25 μL,其中含有 12.5 μL 2 倍反应混合液、1 μL 正向引物 S7P1(10 μmol/L)、1 μL 反向引物 S7P2(10 μmol/L)、1 μL 反转录酶和 Taq 酶混合物、

3  $\mu\text{L}$  从被检样品中提取的 RNA 和 6.5  $\mu\text{L}$  DEPC 处理过的水。每份被检样品检测 2 次。每次检测设置标准阳性对照和标准阴性对照。标准阳性对照用阳性对照 RNA 作为模板,而标准阴性对照用 DEPC 处理过的水作为模板。

4.1.5.3.11 置于 PCR 扩增仪上进行 RT-PCR 扩增反应。RT-PCR 扩增反应的条件如下:50 $^{\circ}\text{C}$ , 30 min 进行反转录;94 $^{\circ}\text{C}$ , 2 min 进行 Taq 酶的激活;40 个循环的 PCR(94 $^{\circ}\text{C}$ , 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ , 1.5 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ , 2.5 min);72 $^{\circ}\text{C}$ , 7 min 延伸。

4.1.5.3.12 扩增反应后,用 1% 的琼脂糖凝胶进行核酸电泳,观察扩增片断大小。

4.1.5.3.13 结果判定:如果阳性对照出现 1 179 bp 大小的特异的扩增条带,阴性对照无任何扩增条带,说明检测结果成立。当该检测样品出现 1 179 bp 大小的特异的扩增条带,检测结果为 RT-PCR 检测阳性。

4.1.5.3.14 序列测定和分析。RT-PCR 检测阳性的扩增产物交付有关公司进行序列测定,序列测定的结果进行序列分析,如在 GenBank(网址:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)中进行最相似序列搜寻(BLAST),如果样品序列为特异的非洲马瘟病毒 VP7 基因序列,则说明受检样品检测结果为非洲马瘟病毒病原核酸阳性。

## 4.2 血清学试验

### 4.2.1 间接酶联免疫吸附试验(ELISA)

以重组 VP7 蛋白为抗原,检测 AHSV 抗体。

#### 4.2.1.1 器材

ELISA 反应板,酶联免疫吸附检测仪,加样器等。

#### 4.2.1.2 试剂

##### 4.2.1.2.1 重组 AHSV 抗原。

4.2.1.2.2 包被液:0.05 mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液(见第 B.11 章)。

4.2.1.2.3 洗涤液:含 0.05% 吐温-20 的 pH7.4 的 PBS(见第 B.13 章)。

4.2.1.2.4 封闭液及抗体稀释液:含 3% 牛血清白蛋白(BSA)的 pH7.4 的 PBS(见第 B.14 章)。

4.2.1.2.5 辣根过氧化物酶-抗马  $\gamma$  球蛋白结合物。

4.2.1.2.6 底物:A 液、B 液(见第 B.15 章)。

4.2.1.2.7 终止液:1 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$ (见第 B.16 章)或 10% 洗洁精(见第 B.17 章)。

#### 4.2.1.3 操作方法

4.2.1.3.1 抗原包被:将重组 AHSV-4VP7 以 0.05 mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液(包被液)稀释,包被酶标板,4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。

4.2.1.3.2 洗板:以 0.05% 吐温-20 溶液(洗涤液)洗酶标板 5 次,将酶标板在吸附材料上轻拍,除去剩余冲洗液。

4.2.1.3.3 封闭:以含 3% BSA 的 pH7.4 PBS 封闭酶标板,200  $\mu\text{L}$ /孔,于 37 $^{\circ}\text{C}$  放置 1 h。

4.2.1.3.4 弃去封闭液,将酶标板在吸附材料上轻拍。

4.2.1.3.5 加待检血清和对照血清:将待检血清、阳性和阴性对照血清,以含 3% BSA 的 pH7.4 的 PBS(抗体稀释液)按 1:40 稀释,每孔加入 100  $\mu\text{L}$ ,37 $^{\circ}\text{C}$  培养 1 h。如测量抗体效价,将待检血清自 1:40 稀释开始,进行 2 倍连续稀释后,加入酶标板(100  $\mu\text{L}$ /孔),每排孔加一份血清,阳性和阴性对照做法相同。37 $^{\circ}\text{C}$  放置 1 h。

4.2.1.3.6 按步骤 4.2.1.4.2 冲洗酶标板。

4.2.1.3.7 加酶标结合物:将辣根过氧化物酶-抗马  $\gamma$  球蛋白结合物以含 3% BSA pH7.4 的 PBS(抗体稀释液)稀释,加入各孔(100  $\mu\text{L}$ /孔),37 $^{\circ}\text{C}$  放置 1 h。

4.2.1.3.8 按步骤 4.2.1.4.2 洗酶标板。

4.2.1.3.9 加底物溶液:按 100  $\mu\text{L}$ /孔加入新配制的底物溶液。

4.2.1.3.10 终止反应:约 5 min~10 min 后,加入 100  $\mu$ L 1 mol/L  $H_2SO_4$  或 10%洗洁精终止显色反应(阴性对照开始显色之前)。

4.2.1.3.11 读数及结果判定:如果用 1 mol/L  $H_2SO_4$  终止,于 450 nm 判读结果;如果用 10%洗洁精终止,于 620 nm 判读结果。临界值的计算为阴性对照吸收值加 0.6(0.6 为用一组 30 份阴性血清获得的标准差),如待检血清的光吸收值低于临界值判为阴性,如高于临界值+0.15 判为阳性,如吸收值介于临界值和临界值+0.15 之间则判为可疑,需采用另一种方法以证实这一结果。

#### 4.2.2 微量补体结合反应(MCF)

微量补体结合反应(MCF)检测 AHSV 抗体。

##### 4.2.2.1 材料

4.2.2.1.1 含 1%明胶的巴比妥缓冲盐液(见第 B.9 章)。

4.2.2.1.2 血清样品,无红细胞,必须加热灭活:马血清 56℃,斑马血清 60℃,驴血清 62℃,灭活 30 min。

4.2.2.1.3 抗原是 AHSV 感染鼠脑的蔗糖丙酮提取物,对照抗原是用同样方法提取的未感染鼠脑(制备方法见附录 A)。在缺乏国际标准血清时,抗原应用本地制备的阳性对照血清进行滴定,在试验中,使用 4 个~8 个单位。

4.2.2.1.4 补体(C')是正常的豚鼠血清。

4.2.2.1.5 溶血素是用绵羊红细胞(SRBCs)制备的兔血清。

4.2.2.1.6 SRBCs 由无菌静脉采血获得,并保存在阿氏液中。

4.2.2.1.7 溶血素系统(HS)是将溶血素稀释成含 2 个溶血素剂量并用其来致敏洗过的 SRBCs 制备而成,SRBCs 被标化成 3%浓度。

4.2.2.1.8 对照血清,阳性对照血清由当地获取并得到证实。来自健康的抗体阴性马的血清用作阴性对照血清。

4.2.2.1.9 “U”形底 96 孔微量滴定板,微量可调移液器及配套枪头,转头可插入微量滴定板的离心机,光电比色计。

##### 4.2.2.2 操作方法

4.2.2.2.1 血清、补体和抗原在 96 孔圆底微量板中进行反应,于 4℃反应 18 h。设以下对照:

- 血清和补体;
- 血清和 SRBCs;
- 分别加有 4CH<sub>50</sub>(50%补体溶血单位)、2CH<sub>50</sub>和 1CH<sub>50</sub>补体的 CF 抗原和对照抗原;
- CF 抗原和 SRBCs;
- 对照抗原和 SRBCs;
- 4CH<sub>50</sub>、2CH<sub>50</sub>稀释的补体;
- SRBCs。

4.2.2.2.2 在微量板各孔中加入致敏的 SRBCs(3%)。

4.2.2.2.3 试验板置于 37℃放置 30 min。

4.2.2.2.4 将微量板以 1 000 r/min 离心 5 min。

4.2.2.2.5 记录所有孔的溶血情况。以 50%溶血作为终点读取结果。

##### 4.2.2.2.6 结果判定

试验成立的条件:

——当空白对照孔 g)完全不溶血(++++);

——补体对照孔 f)完全溶血(-);

——其他各项组合对照孔 a)、b)、c)、d)、e)完全溶血(-),说明试验结果成立;

——与 CF 抗特异性结合补体的血清最高稀释度的倒数即为其效价。效价 1/10 或更高为阳性,低于 1/10 为阴性。

## 附录 A

(规范性附录)

## 非洲猪瘟 MCF 抗原的制备方法

抗原制备采用蔗糖-丙酮抗原,其方法是:

将感染鼠脑加入 4 倍量 8.5% 蔗糖(冷)溶液,置玻璃研磨器中充分研磨后,徐徐滴加到 20 倍(冷)丙酮内,边加边搅拌,静置 15 min 后,弃去上清(丙酮),留下粉红色胶状沉淀物,再加入 20 倍(冷)丙酮,充分搅拌,冰浴 1 h 以上,去上清(丙酮),将沉淀物置于干燥器内,用真空泵抽干呈均匀粉末,加入相当于匀浆总量的 0.4 倍的巴比妥缓冲液(BBS)(见附录 B.8),置 4℃ 冰箱中过夜,置玻璃研磨器中充分研磨后,经 3 000 r/min~3 500 r/min 离心 1 h,取上清液,置 4℃ 冰箱保存备用。

用作抗原对照的健康鼠脑(HMB)亦同样按蔗糖-丙酮法处理。



**附 录 B**  
(规范性附录)  
试剂的配制

**B.1 磷酸盐缓冲液(PBS)****B.1.1 0.1 mol/L PBS**

|                                          |          |
|------------------------------------------|----------|
| 氯化钠(NaCl)                                | 80.0 g   |
| 氯化钾(KCl)                                 | 2.0 g    |
| 磷酸二氢钾(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )  | 30.0 g   |
| 磷酸氢二钠(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) | 2.0 g    |
| 双蒸馏水(ddH <sub>2</sub> O)                 | 1 000 mL |

103 kPa 高压蒸汽灭菌 30 min。室温或 4℃ 冰箱保存。

**B.1.2 0.04 mol/L PBS(pH7.2~7.4)**

|                          |        |
|--------------------------|--------|
| 0.1 mol/L PBS            | 400 mL |
| 双蒸馏水(ddH <sub>2</sub> O) | 600 mL |

103 kPa 高压蒸汽灭菌 30 min。室温或 4℃ 冰箱保存。

**B.1.3 50%甘油-磷酸盐缓冲液(PBS,pH7.4)**

0.04 mol/L PBS 与纯甘油(分析纯)等量混和,调整 pH 至 7.4 分装为小瓶,经 103 kPa 高压蒸汽灭菌 30 min,室温或 4℃ 冰箱保存。

**B.1.4 加青霉素链霉素的磷酸盐缓冲液(PBS,pH7.2~7.4)**

加入终浓度 100 IU/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 0.04 mol/L PBS(pH7.2~7.4)。

**B.2 MEM 完全营养液和维持液****B.2.1 MEM(最底限度必需氨基酸营养液)基础营养液**

|                        |             |
|------------------------|-------------|
| MEM 干粉                 | 9.5 g       |
| 碳酸氢钠                   | 2.2 g       |
| 蒸馏水(dH <sub>2</sub> O) | 加至 1 000 mL |

溶解后过滤除菌,4℃ 保存。

**B.2.2 MEM 完全营养液(pH7.2)**

MEM 基础营养液中加下列成分使达到最终浓度:

10%灭活犊牛血清;  
100 IU/mL 青霉素及 100 μg/mL 链霉素;  
2 mmol 谷氨酰胺。

**B.2.3 MEM 维持液(pH7.2)**

MEM 基础营养液中加下列成分使达到最终浓度:

10%灭活犊牛血清;  
100 IU/mL 青霉素及 100 μg/mL 链霉素;  
2 mmol 谷氨酰胺。

**B.3 200 mmol/L L-glutamin(谷氨酰胺)溶液(母液)**

|                          |         |
|--------------------------|---------|
| 谷氨酰胺(L-glutamine)        | 2.923 g |
| 双蒸馏水(ddH <sub>2</sub> O) | 100 mL  |

**B.4 75%乙醇**

|            |           |
|------------|-----------|
| 无水乙醇       | 75 mL     |
| DEPC 处理过的水 | 加至 100 mL |

**B.5 DEPC 处理过的水**

|      |          |
|------|----------|
| DEPC | 1 mL     |
| 去离子水 | 1 000 mL |

充分混匀,将瓶盖拧松后置于 37℃ 放置过夜,高压灭菌。

**B.6 0.5×Tris 碱-硼酸-乙二胺四乙酸(EDTA)(TBE)缓冲液****B.6.1 5×Tris 碱-硼酸-乙二胺四乙酸(EDTA)(TBE)缓冲液**

|                              |        |
|------------------------------|--------|
| Tris 碱                       | 54 g   |
| 硼酸                           | 27.5 g |
| 0.5 mol/L pH8.0 乙二胺四乙酸(EDTA) | 20 mL  |

**B.6.2 0.5×Tris 碱-硼酸-乙二胺四乙酸(EDTA)(TBE)缓冲液**

|                                |          |
|--------------------------------|----------|
| 5×0.5 mol/L pH8.0 乙二胺四乙酸(EDTA) | 1 mL     |
| 蒸馏水                            | 加至 10 mL |

**B.7 1%的琼脂糖凝胶****B.7.1 配方**

|                  |        |
|------------------|--------|
| 琼脂糖              | 0.5 g  |
| 0.5×TBE 缓冲液      | 50 mL  |
| 溴化乙锭溶液(10 mg/mL) | 2.5 μL |

**B.7.2 配法**

称取 0.5 g 琼脂糖,置于 200 mL 锥形瓶中,加入 50 mL 1×TBE 缓冲液,加热溶解,冷却至 50℃~60℃ 时加入 2.5 μL 溴化乙锭溶液,倒入胶槽内自然凝固。

**B.8 巴比妥缓冲液(BBS)****B.8.1 配方**

|                                                |          |
|------------------------------------------------|----------|
| 氯化钠 NaCl(分析纯)                                  | 85.0 g   |
| 氯化镁(MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O)(分析纯) | 1.68 g   |
| 氯化钙 CaCl <sub>2</sub> (分析纯)                    | 0.28 g   |
| 巴比妥(化学纯)                                       | 5.75 g   |
| 巴比妥钠(化学纯)                                      | 2.00 g   |
| 无离子水                                           | 2 000 mL |

**B.8.2 配法**

将巴比妥加入 500 mL 无离子水内,加热溶解后再加入其他成分和适量无离子水溶解后,无离子水加至 2 000 mL,分装,103 kPa 高压灭菌 20 min,冷却后置冰箱内保存备用。临用时稀释 5 倍。

**B.9 1%明胶巴比妥缓冲液****B.9.1 配方**

|    |       |
|----|-------|
| 明胶 | 5.0 g |
|----|-------|

|     |        |
|-----|--------|
| BBS | 500 mL |
|-----|--------|

**B.9.2 配法**

将明胶溶于 30 mL 35℃BBS 中,然后将其余 BBS 加入,混匀备用。

**B.10 阿氏液****B.10.1 配方**

|      |          |
|------|----------|
| 葡萄糖  | 24.60 g  |
| 氯化钠  | 5.04 g   |
| 柠檬酸钠 | 9.60 g   |
| 无离子水 | 1 200 mL |

**B.10.2 配法**

将试剂溶化后,过滤,分装成 6 瓶,用 70 kPa 灭菌 20 min,置 4℃冰箱保存备用。

**B.11 包被液——0.05 mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液**

|      |         |
|------|---------|
| 碳酸钠  | 0.318 g |
| 碳酸氢钠 | 0.588 g |
| 去离子水 | 200 mL  |

用 0.22 μm 膜过滤除菌,室温保存备用。

**B.12 pH7.4 PBS**

|                                                               |        |
|---------------------------------------------------------------|--------|
| 氯化钠                                                           | 8.00 g |
| 氯化钾                                                           | 0.20 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( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )                             | 0.20 g |

加去离子水 900 mL,用盐酸调 pH 至 7.4,然后定容至 1 000 mL。

**B.13 洗涤液——含 0.05%吐温-20 的 pH7.4 的 PBS**

|           |          |
|-----------|----------|
| 吐温-20     | 0.5 mL   |
| pH7.4 PBS | 1 000 mL |

**B.14 封闭液及抗体稀释液——含 3%BSA 的 pH7.4 PBS**

|             |        |
|-------------|--------|
| 牛血清白蛋白(BSA) | 3 g    |
| pH7.4 PBS   | 100 mL |

封闭液应现用现配。

**B.15 底物****B.15.1 A 液**

|                                    |         |
|------------------------------------|---------|
| 磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) | 3.682 g |
| 柠檬酸                                | 1.021 g |
| 过氧化氢尿素                             | 0.06 g  |
| 去离子水                               | 100 mL  |

避光 4℃~8℃ 保存, 尽量现用现配。

#### B. 15.2 B 液

|                  |         |
|------------------|---------|
| 柠檬酸              | 1.05 g  |
| EDTA(乙二胺四乙酸)     | 14.6 mg |
| TMB(3,3'-二氨基联苯胺) | 25.0 mg |
| 去离子水             | 100 mL  |

用 0.45 μm 滤膜过滤, 避光 4℃~8℃ 保存, 尽量现用现配。

#### B. 15.3 用法

使用时, 将 A 液、B 液按 1 : 1 的比例混合。

#### B. 16 1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

|      |         |
|------|---------|
| 浓硫酸  | 5.5 mL  |
| 去离子水 | 94.5 mL |

将浓硫酸缓缓加到蒸馏水中, 混匀。

#### B. 17 10%洗洁精

|      |       |
|------|-------|
| 洗洁精  | 10 mL |
| 去离子水 | 90 mL |

混匀备用。

---