

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 680—2003

禽白血病毒 p27 抗原 酶联免疫吸附试验方法

Enzyme-linked immunosorbent assay
for avian leukosis virus p27 antigen

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：陈西钊、苏敬良、王宏伟、田克恭、吴清民、王传彬。

禽白血病病毒 p27 抗原 酶联免疫吸附试验方法

1 范围

本标准规定了禽白血病病毒(ALV)p27 抗原酶联免疫吸附试验方法。

本标准适用于检测鸡蛋蛋清以及鸡胚组织细胞培养物中的 ALV p27 蛋白抗原。

2 p27 抗原酶联免疫吸附试验

2.1 试验材料

2.1.1 试剂

- 2.1.1.1 抗 p27 蛋白抗体:应用提纯的禽成髓细胞性白血病病毒 p27 蛋白免疫家兔制备。
- 2.1.1.2 阳性抗原:含鸡白血病/肉瘤病毒群特异性 p27 蛋白抗原的鸡蛋清。
- 2.1.1.3 阴性抗原:无鸡白血病/肉瘤病毒群特异性 p27 蛋白抗原的 SPF 鸡蛋清。
- 2.1.1.4 酶结合物:辣根过氧化物酶标记的抗 p27 蛋白抗体。
- 2.1.1.5 磷酸盐缓冲液(PBS):配制见第 A.1 章。
- 2.1.1.6 包被液:配制见第 A.2 章。
- 2.1.1.7 洗涤液:配制见第 A.3 章。
- 2.1.1.8 样品稀释液:配制见第 A.4 章。
- 2.1.1.9 底物溶液:配制见第 A.6 章。
- 2.1.1.10 终止液:配制见第 A.7 章。

2.1.2 器材

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

2.1.3 样品

- 2.1.3.1 鸡蛋样品:将待检鸡蛋小的一端朝上放置,打碎蛋壳,用移液器无菌吸取蛋清,密装于灭菌小瓶内。
- 2.1.3.2 细胞培养物:用移液器无菌吸取细胞培养物,密装于灭菌小瓶内,4 $^{\circ}\text{C}$ 或 -30 $^{\circ}\text{C}$ 保存或立即送检。试验前将送检样品统一编号,试验时不做稀释。

2.2 操作方法

- 2.2.1 用包被液将抗 p27 蛋白抗体作 4 000 倍稀释,每孔 100 μL 加入 96 孔聚苯乙烯板中,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。
- 2.2.2 取出包被好的聚苯乙烯板,将液体倒弃,每孔加 250 μL 洗涤液漂洗三次,每次 2 min,甩干。
- 2.2.3 每孔加 150 μL 质量浓度为 1% 的明胶封闭液,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 60 min。
- 2.2.4 重复 2.2.2。
- 2.2.5 在 A₁、A₂ 孔各加 100 μL 标准阴性对照,A₃、A₄ 孔各加 100 μL 标准阳性对照。
- 2.2.6 将待检样品加入其他各孔,每个待检样本加两孔,每孔 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 60 min。
- 2.2.7 重复 2.2.2。
- 2.2.8 每孔加 100 μL 工作浓度的辣根过氧化物酶标记的抗 p27 蛋白抗体,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 60 min。

2.2.9 重复 2.2.2。

2.2.10 每孔加 100 μL 新配制的底物溶液,室温,避光反应 10 min。

2.2.11 每孔加 100 μL 终止液。

2.2.12 置酶联检测仪于 450 nm 测定各孔吸光度(OD)值。

2.3 结果判定

2.3.1 阴性对照 OD 均值等于 $(A_1 \text{ 孔 OD 值} + A_2 \text{ 孔 OD 值})/2$;阳性对照 OD 均值等于 $(A_3 \text{ 孔 OD 值} + A_4 \text{ 孔 OD 值})/2$ 。

2.3.2 阴性对照 OD 均值小于 0.15,阳性对照 OD 均值减去阴性对照 OD 均值大于 0.3 时试验成立,否则重做。

2.3.3 S/P 等于 $(\text{样品孔 OD 均值} - \text{阴性对照 OD 均值}) \div (\text{阳性对照 OD 均值} - \text{阴性对照 OD 均值})$ 。

待检样本 S/P 小于等于 0.2 判为阴性,表示待检样品中无 ALVs p27 蛋白抗原。

待检样本 S/P 大于 0.2 判为阳性,表示待检样品中有 ALVs p27 蛋白抗原。

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 包被液(0.05 mol/L pH9.6)

碳酸钠	1.59 g
碳酸氢钠	2.93 g
蒸馏水	加至 1 000 mL

A.3 洗涤液

PBS	1 000 mL
Tween-20	0.5 mL

A.4 样品稀释液

含体积分数 10% 新生牛血清的洗涤液。

A.5 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.6 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% 的浓度,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.7 终止液

硫酸	58 mL
蒸馏水	442 mL
