

ICS 65.020.30
B 44



中华人民共和国国家标准

GB/T 14926.50—2001

实验动物 微生物学检测方法(3)

Laboratory animal—Microbiological examination methods

2001-08-29 发布

2002-05-01 实施



中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

GB/T 14926.50—2001

前 言

本标准修订了GB/T 14926.18—1994《实验动物 淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒检测方法》中的酶联免疫吸附试验方法,将其作为一个独立标准列出。

本标准由中华人民共和国科学技术部提出并归口。

本标准起草单位:中国实验动物学会。

本标准主要起草人:贺争鸣。

中华人民共和国国家标准

实验动物 酶联免疫吸附试验

GB/T 14926.50—2001

Laboratory animal—Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)

1 范围

本标准规定了酶联免疫吸附试验(ELISA)所用试剂、器材和操作步骤等。
本标准适用于实验动物病毒抗体的检测。

2 原理

包被于固相载体表面的已知抗原与待检血清中的特异性抗体结合形成免疫复合物。此抗原抗体复合物仍保持其抗原活性,可与相应的第二抗体酶结合物结合。在酶的催化作用下底物发生反应,产生有色物质。颜色反应的深浅与待检血清中所含有的特异性抗体的量成正比。

3 主要试剂和器材

3.1 试剂

3.1.1 抗原

3.1.1.1 特异性抗原

将病毒接种其敏感细胞培养增殖(表1),当细胞病变达+++~++++时收获,冻融三次或超声波处理后,低速离心去除细胞碎片,上清液再经超速离心浓缩后制成ELISA抗原。

3.1.1.2 正常抗原

未接种病毒的相应细胞冻融破碎后,经低速离心去除细胞碎片而获得的上清液。

3.1.2 酶结合物

ELISA法常用以下两类酶结合物。

3.1.2.1 辣根过氧化物酶标记羊或兔抗小鼠、大鼠、豚鼠、地鼠、兔、犬或猴IgG抗体。用于检测相应动物血清抗体。

3.1.2.2 辣根过氧化物酶标记葡萄球菌蛋白A(SPA)。用于检测小鼠、豚鼠、兔、犬和猴血清抗体。

3.1.3 对照血清

3.1.3.1 阳性血清

用病毒抗原免疫清液或SPF小鼠、大鼠、豚鼠、地鼠或普通级兔、犬、猴所获得的抗血清;或自然感染恢复后的犬、猴血清。

3.1.3.2 阴性血清

清液或SPF小鼠、大鼠、豚鼠、地鼠血清;或确认无相应病毒感染的兔、犬、猴血清。

3.1.4 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

3.1.5 PBS(0.01 mol/L pH7.4)

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 2001-08-29 批准

2002-05-01 实施

- | | |
|---|-------------|
| 氯化钠 | 8 g |
| 氯化钾 | 0.2 g |
| 磷酸二氢钾 | 0.2 g |
| 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) | 2.83 g |
| 蒸馏水 | 加至 1 000 mL |
- 3.1.6 洗涤液
- | | |
|-----------------------|----------|
| PBS(0.01 mol/L pH7.4) | 1 000 mL |
| Tween-20 | 0.5 mL |
- 3.1.7 稀释液 含 10% 小牛血清的洗涤液。
- 3.1.8 磷酸盐-柠檬酸缓冲液(pH5.0)
- | | |
|---|--------|
| 柠檬酸 | 3.26 g |
| 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) | 12.9 g |
| 蒸馏水 | 700 mL |
- 3.1.9 底物溶液
- | | |
|-------------------|-----------------|
| 磷酸盐-柠檬酸缓冲液(pH5.0) | 10 mL |
| 邻苯二胺(OPD) | 4 mg |
| 30%过氧化氢 | 2 μL |
- 3.1.10 终止液(2 mol/L 硫酸)
- | | |
|-----|--------|
| 硫酸 | 58 mL |
| 蒸馏水 | 442 mL |
- 3.2 器材
- 3.2.1 酶标仪。
- 3.2.2 聚苯乙烯板,40孔、55孔或96孔(可拆或不可拆),用前洗净晾干,在紫外线下20 cm处照射1 h。
- 3.2.3 微量加样器;容量5~50 μL 、50~200 μL 。
- 3.2.4 37℃培养箱。
- #### 4 操作步骤
- 4.1 包被抗原
- 根据滴定的最适工作浓度,将特异性抗原和正常抗原分别用包被液稀释。每孔100 μL ,置37℃1 h后再4℃过夜。
- 4.2 用洗涤液洗5次,每次3 min,叩干。
- 4.3 加样
- 待检血清和阴性、阳性对照血清分别用稀释液做1:40稀释,分别加入两孔(特异性抗原孔和正常抗原孔),每孔100 μL ,37℃1 h,洗涤同上。
- 4.4 加酶结合物
- 用稀释液将酶结合物稀释成适当浓度,每孔加入100 μL ,37℃1 h,洗涤同上。
- 4.5 加底物溶液
- 每孔加入新配制的底物溶液100 μL ,置37℃,避光显色10~15 min。
- 4.6 终止反应
- 每孔加入终止液50 μL 。
- 4.7 测A值
- 在酶标仪上,于490 nm处读出各孔A值。

5 结果判定

在阴性和阳性对照血清成立的条件下,进行结果判定。

- 5.1 同时符合下列3个条件者,判为阳性。
 - 5.1.1 待检血清与正常抗原和特异性抗原反应有明显的颜色区别;
 - 5.1.2 待检血清与特异性抗原反应的A值 ≥ 0.2 ;
 - 5.1.3 待检血清与特异性抗原反应的A值/阴性对照血清与特异性抗原反应的A值 ≥ 2.1 。
- 5.2 均不符合上述3个条件者,判为阴性。
- 5.3 仅有1~2条符合者,判为可疑。需选用同一种方法或另一种方法重试。

表1 ELISA 抗原的制备

病毒	细胞、鸡胚	收获时间/d	细胞病变
HV	E6	10~14	—
LCMV	Vero	7~10	+++~++++
Ect.	BHK21, Vero	2~3	++~+++
MHV	DBT, J929	2~4	+++~++++
Sendai	GM5	3	+++~++++
Reo3	BSC2, BHK21	4~5	++++
PVM	BHK21	10~14	++~+++
TMEV	BHK21	5~6	++++
MVM	ME, 3T3	7~10	++++
MAe	MK, ME, 3T3	3~5	++++
Polyoma	ME, 3T3	10~14	+++~++++
KRV	RE	7~12	+++~++++
H-1	RE	7~12	+++~++++
RCV/SFV	DBT, J929	2~3	+++~++++
RRV	MA-104	2~3	+++~++++
RV	BHK21	6~7	+++~++++
CPV	FK53	3~5	+++~++++
ICHV	MEX-K	1~3	+++~++++
CDV	Vero	8~10	+++~++++
B Virus	Vero	3~2	+++~++++
SRV	Rat	10~14	细胞融合
SIV	CM-173	10~14	细胞融合
SPV	BHK21	2~3	+++~++++

注: MK-小鼠肾细胞, ME-小鼠胚胎细胞, RE-大鼠胚组织。