

## 前 言

马传染性贫血病(简称马传贫,下同)的流行,曾给我国养马业造成巨大的经济损失。经过多年的防制,在全国范围内取得显著成效,已达到控制标准。为消灭马传贫,提供一个先进有效、特异敏感、反应快速、操作方便、易于推广的检测方法,是十分必要的。为此制定马传染性贫血病间接 ELISA 技术规程。

马传贫间接 ELISA 技术自 1983 年建立以来,已在全国主要养马省区推广应用十余年之久,在马传贫防制工作中发挥了重要作用。特别是研制的试剂实现了标准化、商品化,并以低耗优质的产品,为该方法推广应用奠定了基础,在这方面我们已走在世界前列。

本标准的附录 A、附录 B、附录 C 都是标准的附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由中华人民共和国农业部畜牧兽医司归口。

本标准由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所负责起草。

本标准起草人:戴玉坤。

# 中华人民共和国国家标准

## 马传染性贫血病间接 ELISA 技术规程

GB/T 17494—1998

Rules of indirect ELISA technique  
for equine infectious anemia disease

### 1. 范围

本标准规定了马传染性贫血病间接 ELISA 技术规程的测定原理、仪器设备、试剂、配制溶液、操作步骤、结果判定。

本标准适用于检测马血清中的马传贫疫毒抗体。可用于生产和经营马匹者对未注射马传贫疫苗马匹的检疫,马传贫病马的定性;也可用于对注射马传贫疫苗马匹的免疫状态进行测定。

### 2 引用标准

下列标准所包含的条文,通过在本标准中引用而构成本标准的条文。本标准出版时,所示版本均为有效。所有标准都会被修订,使用本标准的各方应探讨使用下列标准最新版本的可能性。

NY 127—1987 马传贫酶联免疫吸附试验(ELISA 间接法)抗原、酶标记抗体制造及检验试行规程

### 3 测定原理

用特制的马传贫病毒抗原(NY 127),包被聚苯乙烯微量板孔,使免疫反应在固相载体上进行。当被检血清中有马传贫病毒抗体存在时,则与孔壁上的抗原形成抗原-抗体复合物,再与酶标记的抗体(抗马免疫球蛋白)反应,最后通过测定酶作用底物催化后的产物,进行定性、定量抗体测定。

### 4 仪器设备

吸管: 1 mL、5 mL、10 mL;  
量桶: 50 mL、100 mL、1 000 mL;  
烧杯: 50 mL、100 mL;  
玻璃滴管: 每滴体积约 20~30  $\mu$ L;  
血清稀释板: 20 孔板每孔容积为 1 mL;  
定量加液器: 1 mL 分装定量;  
微量吸液器: 50  $\mu$ L、100  $\mu$ L;  
分析天平: 感量 0.001 g;  
托盘天平: 感量 0.01 g;  
水浴锅;  
酶标测试仪。

### 5 试剂

除特别注明外,所用试剂皆为分析纯。

国家质量技术监督局 1998-08-31 批准

1999-01-01 实施

磷酸氢二钠;  
 磷酸二氢钠;  
 氯化钠;  
 柠檬酸;  
 邻苯二胺(化学纯);  
 过氧化氢(浓度 30%);  
 吐温-20(Tween-20);  
 白明胶(Gelatin white) (E. Merck);  
 健康牛血清(无污染);  
 浓硫酸(纯度 95%~98%);  
 酶标记抗体(冻干品,活性和特异性应符合 NY 127,见附录 A);  
 马传贫病毒抗原包被板(活性和特异性应符合 NY 127,见附录 B);  
 阴性及阳性对照血清(冻干品,活性和特异应符合 NY 127)。

## 6 配制溶液

### 6.1 磷酸盐缓冲液(0.02 mol/L pH7.2 PBS)

6.1.1 0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液:称取磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )71.64 g,先加适量的去离子水加热溶解,最后定容至 1 000 mL,混匀。

6.1.2 0.2 mol/L 磷酸二氢钠溶液:称取磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )31.21 g,先加适量的去离子水加热溶解,最后定容至 1 000 mL,混匀。

6.1.3 量取 0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液 360 mL,0.2 mol/L 磷酸二氢钠溶液 140 mL,称取氯化钠 38 g,混在一起,用去离子水溶解稀至 5 000 mL。

### 6.2 洗液(0.02 mol/L pH7.2 PBS-0.05%吐温-20)

量取 0.02 mol/L pH7.2 PBS 1 000 mL,加入 0.5 mL 吐温-20,混匀。

### 6.3 血清及酶标记抗体稀释液(0.02 mol/L pH7.2 PBS-0.05%吐温-20-0.1%白明胶-10%健康牛血清)

量取洗液(6.2)100 mL,加入 100 mg 白明胶加热溶解,冷却后量取 90 mL,加入健康牛血清 10 mL,混匀。

### 6.4 底物溶液(pH5.0 磷酸盐-柠檬酸缓冲液,内含 0.04%邻苯二胺及 0.045%过氧化氢)

6.4.1 pH5.0 磷酸盐-柠檬酸缓冲液:称取柠檬酸( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )21.01 g,用去离子水溶解,定容至 1 000 mL。量取 243 mL 与 0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液(6.1.1)257 mL 混合,于 4℃ 冰箱中保存不超过一周。

6.4.2 称取 40 mg 邻苯二胺,溶于 100 mL pH5.0 磷酸盐-柠檬酸缓冲液(6.4.1)中(用前从 4℃ 冰箱中取出,在室温下放置 20~30 min 平衡温度),待溶解后,加入 150  $\mu\text{L}$  过氧化氢混匀。根据试验所需量按此比例增减。现用现配,剩余液废弃。

### 6.5 终止剂:2 mol/L 硫酸

量取浓硫酸 4 mL 加入 32 mL 去离子水中,混匀。

## 7 操作步骤

### 7.1 洗板

去掉抗原包被板的密封条及板孔保护膜,向各孔注入洗液,浸泡约 3 min,甩干,再重新注入洗液,重复洗三次,甩净孔内残液,再在滤纸上拍打吸干。

### 7.2 加被检血清及对照血清

将被检血清登记编号后,用 50  $\mu\text{L}$  微量吸液器依次各取 50  $\mu\text{L}$  加入到血清稀释板的各孔内(每份血清各用 1 个加样嘴)。用定量加液器,将 0.95 mL 的稀释液(6.3)依次加入装有血清的各孔内,使血清做 1:20 倍稀释。混匀后用 100  $\mu\text{L}$  微量吸液器将被检血清依次加入抗原包被板孔内(每份血清各用 1 个加样嘴),每份血清加两个孔。

每块反应板均需设阳性对照及阴性对照血清。冻干的阴、阳性对照血清,按瓶上标注量加入稀释液(6.3),溶解后加入上述包被板孔内。阴、阳性对照血清各两孔,每孔 100  $\mu\text{L}$ 。盖好板盖,置 37 $^{\circ}\text{C}$  水浴中,保温 1 h。

### 7.3 洗板

甩掉板孔内的血清,向各孔注入洗液,按(7.1)方法洗三次,甩净孔内残液,再在滤纸上拍打吸干。

### 7.4 加酶标记抗体

按瓶签标注量,用稀释液(6.3)将冻干酶标记抗体溶解混匀后,每孔加 100  $\mu\text{L}$ ,盖好板盖,置 37 $^{\circ}\text{C}$  水浴中,保温 1 h。

### 7.5 洗板

甩掉板孔内的酶标记抗体,向各孔注入洗液,按(7.1)方法洗三次,甩净孔内残液,再在滤纸上拍打吸干。

### 7.6 加底物溶液

用 100  $\mu\text{L}$  微量吸液器,每孔加新配制的底物溶液 100  $\mu\text{L}$ ,在室温下避光反应大约 5~10 min(见附录 C)。

### 7.7 终止反应

用玻璃滴管每孔滴加终止剂 1 滴。

## 8 结果判定

### 8.1 目测法

阳性对照血清孔呈鲜明的桔黄色,阴性对照血清孔无色或基本无色,被检血清孔凡显色者即判为马传贫病毒抗体阳性。如遇颜色反应较弱,但与阴性对照血清孔还有差异者,用目测法难以判定时,则以比色法测定结果为最终结果。

### 8.2 比色法

用酶标测试仪,在波长 492 nm 下,测定各孔 OD 值,阳性对照血清的两孔平均 OD 值大于 1.0,阴性对照血清的两孔平均 OD 值小于或等于 0.2 为正常反应。按以下两个条件判定结果:被检血清的两孔平均 OD 值与阴性对照血清的两孔平均 OD 值之比,大于或等于 2,且被检血清的两孔平均 OD 值在 0.2 以上者,判为马传贫病毒抗体阳性,否则为阴性。

**附录 A**

(标准的附录)

**马传贫酶标记抗体质量的说明**

马传贫酶标记抗体(冻干品),系山羊抗马 IgG 与辣根过氧化物酶的结合物。对标准阳性血清的平切终点(PEP)应 $\leq 0.25 \mu\text{g/mL}$ ,平切滴度(PT)应 $\geq 1:10\ 240$ 倍。酶标记抗体用二倍平切终点的浓度,对标准阳性血清与标准阴性血清的 1:20 倍稀释液进行测定,阳性吸收值应 $> 1.0$ ,阴性吸收值应 $\leq 0.2$ 。在 $-20^\circ\text{C}$ 下可保存 2 年。

**附录 B**

(标准的附录)

**马传贫病毒抗原包被板质量的说明**

马传贫病毒抗原包被板,系马传贫病毒抗原包被 40 孔或 96 孔聚苯乙烯板制备而成,对标准阳性血清的终点滴度 $\geq 1:20\ 480$ 倍。在 $-20^\circ\text{C}$ 下可保存 2 年。

**附录 C**

(标准的附录)

**底物溶液作用时间的说明**

底物溶液的作用时间与环境温度有关,如温度较高,酶催化作用就快,颜色反应则快。如温度低,酶的催化作用就慢,颜色反应则慢。因此底物的作用时间多依阳性和阴性对照血清颜色变化为准。当阳性对照血清孔呈鲜明的黄色,而阴性对照血清孔无色或基本无色时即要终止反应。标准中规定的底物作用时间 5~10 min,是在不同温度条件下的大致范围。

---