



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1554—2005

鸡传染性法氏囊病酶联免疫吸附 试验操作规程

Protocol of enzyme-linked immunosorbent assay for avian
infectious bursal disease

2005-02-17 发布

2005-07-01 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国家质量监督检验检疫总局

前 言

本标准的附录 A 为规范性附录。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国深圳出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：秦智锋、陈书琨、顾天钊、李环玲。

本标准属首次发布的出入境检验检疫行业标准。

鸡传染性法氏囊病酶联免疫吸附 试验操作规程

1 范围

本标准规定了鸡传染性法氏囊病酶联免疫吸附试验操作方法。

本标准适用于鸡传染性法氏囊病病毒抗体的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(eqv ISO 3696:1987)

3 仪器与试剂

3.1 仪器

3.1.1 酶标仪:具 490 nm 波长滤光片。

3.1.2 96 孔酶标板。

3.1.3 微量加样器:50 μ L、100 μ L。

3.1.4 振荡器。

3.1.5 37℃恒温箱。

3.1.6 微量离心管:1.5 mL。

3.1.7 台式离心机。

3.2 试剂

3.2.1 试剂规格

本标准所用化学试剂除另有特殊规定外,均为分析纯。试剂配制用水需满足 GB/T 6682 的要求。

3.2.2 包被液

碳酸盐缓冲液,0.1 mol/L,pH 9.6,配制方法见第 A.1 章。

3.2.3 洗涤液

含有 0.05%(体积分数)Tween-20 的磷酸盐缓冲液(PBS-T),0.01 mol/L,pH 7.4,配制方法见第 A.2 章。

3.2.4 稀释液

含有 2.5%(质量浓度)牛血清白蛋白的 PBS-T,使用当日配制。

3.2.5 封闭液

含 5%犊牛血清及 0.1%Tween-20 的 TNE 溶液,TNE 溶液配制方法见第 A.3 章。

3.2.6 底物溶液

含有 0.04%(质量浓度)邻苯二胺及 0.1%(体积分数)双氧水的柠檬酸-磷酸盐缓冲液,pH 5.0,现用现配,配制方法见第 A.4 章。

3.2.7 终止液

2 mol/L 硫酸溶液。

3.3 标准抗原、酶标抗体和标准血清

分别为：

- 鸡传染性法氏囊病病毒抗原；
- 酶标羊抗鸡 IgG 抗体；
- 标准阳性血清；
- 标准阴性血清。

4 被检血清

无菌条件下静脉采血 1 mL，分离血清，装于无菌小瓶或试管中，加贴标记后置 4℃ 冰箱中保存备检。

5 操作方法

5.1 包被抗原

将鸡传染性法氏囊病抗原用包被液稀释到工作浓度，每孔加 100 μL，用塑料薄膜盖住酶标板，37℃ 恒温箱中温育 1 h，4℃ 过夜后备用。

5.2 封闭

次日甩干包被液，每孔加封闭液 200 μL，用塑料薄膜盖住酶标板，置 37℃ 恒温箱中温育 90 min。甩干后用洗涤液洗涤 3 次，甩干。

5.3 温育

用稀释液将被检血清作 100 倍稀释，每孔加 100 μL，每份血清加两孔，做平行重复试验。

每板的最后一排加标准阳性血清和标准阴性血清各 2 孔。

置 37℃ 恒温箱中温育 1 h，甩干后用洗涤液洗涤 3 次，甩干。

5.4 加酶标羊抗鸡 IgG 抗体

将酶标羊抗鸡 IgG 抗体用封闭液稀释至工作浓度，每孔加 100 μL，置 37℃ 恒温箱中温育 1 h，甩干后用洗涤液洗涤 3 次，甩干。

5.5 加底物溶液

每孔加新配制的底物溶液 100 μL，37℃ 避光反应 10 min~15 min。

5.6 加终止液

每孔加入 2 mol/L 硫酸溶液 50 μL，终止反应。

5.7 测定 OD 值

用酶标检测仪于波长 490 nm 处测定各孔的 OD 值，必须在加入终止液后 10 min 内完成。

6 结果判定

6.1 判定前提

当标准阳性血清与标准阴性血清的 OD 值的比值大于 2 时，才可进行结果判定。

6.2 计算 P/N 值

待检样品的 P/N 比值按式(1)计算。

$$A = \frac{B}{C} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

A —— P/N 值；

B ——待检血清孔平均 OD 值；

C ——标准阴性血清平均 OD 值。

6.3 判定

P/N 比值大于等于 2 为阳性；小于 1.5 为阴性。

$1.5 \leq P/N < 2$ 为可疑，可疑样品应重检一次，重检后的 P/N 比值大于等于 1.5 判为阳性，小于 1.5 判为阴性。

附 录 A
(规范性附录)
主要试剂配方

A.1 包被液:碳酸盐缓冲液(0.1 mol/L,pH 9.6)

甲液:

碳酸钠(Na_2CO_3)	10.60 g
加蒸馏水或去离子水至	500 mL

乙液:

碳酸氢钠(NaHCO_3)	16.80 g
加蒸馏水或去离子水至	1 000 mL

甲液	16 mL
乙液	34 mL
加蒸馏水或去离子水至	100 mL

A.2 洗涤液:含有 0.05%(体积分数)Tween-20 的磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L,pH 7.4)

磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.20 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2.90 g
氯化钠(NaCl)	8.00 g
氯化钾(KCl)	0.20 g
吐温 20(Tween-20)	0.50 mL
加蒸馏水或去离子水至	1 000 mL

A.3 TNE 溶液

氯化钠(NaCl)	0.9%
三(羧甲基)三氨基甲烷(Tris)	0.05 mol/L
乙二醇四乙酸(EDTA)	0.001 mol/L

A.4 底物溶液

甲液:

柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	21.01 g
加蒸馏水或去离子水至	1 000 mL

乙液:

磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	71.64 g
加蒸馏水或去离子水至	1 000 mL

甲液与乙液按 9.70 : 10.30 的比例混合,即为 pH5.0 的柠檬酸-磷酸盐缓冲液。

底物溶液在临用之前按如下比例配制:

邻苯二胺(OPD)	0.040 g
30%双氧水	0.1 mL
pH 5.0 的柠檬酸-磷酸盐缓冲液	100 mL。

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
鸡传染性法氏囊病酶联免疫吸附
试验操作规程
SN/T 1554—2005

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.bzcbs.com

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

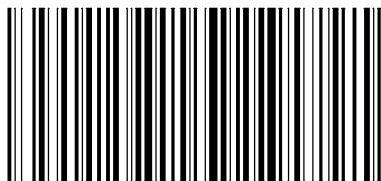
*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 9 千字
2005 年 5 月第一版 2005 年 5 月第一次印刷

*

书号: 155066 · 2-16190 定价 8.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68533533



SN/T 1554-2005