



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3971—2014

小反刍兽疫免疫胶体金试纸卡检测方法

Immunochromatographic assay of colloidal gold for detection of peste des petits ruminants

2014-07-14 发布

2015-03-01 实施



中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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：中华人民共和国西藏出入境检验检疫局、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、中华人民共和国云南出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：杨俊兴、刘忠清、杨云庆、赤列加措、花群义、吕建强、祝贺、孙洁、艾军、唐金明。

小反刍兽疫免疫胶体金试纸卡检测方法

1 范围

本标准规定了小反刍兽疫免疫胶体金试纸卡检测方法。

本标准适用于小反刍兽疫抗体的快速检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

SN/T 2123 出入境动物检疫实验样品采集、运输和保存规范

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BSA:牛血清白蛋白

ICS:免疫层析试纸

PBS:磷酸缓冲液

PPR:小反刍兽疫

PPRV:小反刍兽疫病毒

SPG:链球菌 G 蛋白

4 主要设备

4.1 恒温箱。

4.2 电子天平:精确值 0.000 1 g。

4.3 台式冷冻离心机:最大离心力 15 000 g。

4.4 pH 计。

4.5 试纸喷膜仪。

4.6 试纸条切割机:可连续切割出 2 mm~5 mm 宽试纸。

5 主要试剂和材料

除特别说明外,本标准所用试剂均为分析纯。试验用水为符合 GB/T 6682 规定的三级水。

5.1 1%氯金酸溶液($\text{AuCl}_3 \cdot \text{HCl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)。

5.2 PBS:配方见附录 A。

5.3 PPRV N 蛋白:为基因工程表达蛋白抗原。

5.4 链球菌 G 蛋白(SPG)。

- 5.5 1%柠檬酸钠溶液。
- 5.6 1%碳酸钾溶液(K_2CO_3):配方见附录 A。
- 5.7 抗 SPG 多克隆抗体。
- 5.8 牛血清白蛋白。
- 5.9 硝酸纤维素膜。
- 5.10 玻璃纤维棉纸。
- 5.11 干燥剂。
- 5.12 PPRV 阳性血清,由指定单位提供。
- 5.13 PPRV 阴性血清,由指定单位提供。

6 检测原理

将胶体金标记的 SPG 固定于金标垫,检测线为纯化的 PPRV N 蛋白,对照线为兔抗 SPG。检测时,阳性样品中的抗 PPRV 抗体与胶体金标记 SPG 特异性地结合,在 NC 膜上移动时,被检测线上的 PPRV N 蛋白捕获,胶体金颗粒聚集于此,形成红色的条带,即检测线。相反,阴性样品中不含抗 PPRV 抗体,在检测线处不形成红色条带。对照线试剂兔抗 SPG 与胶体金标记 SPG 结合,捕获金标复合物,形成对照线。

7 免疫胶体金试纸卡的组装

7.1 金标 SPG 及金标垫的制备

首先用 1%碳酸钠溶液调胶体金溶液的 pH 值为 6.5,向 50 mL 胶体金溶液中缓慢地加入适量 SPG 溶液,室温搅拌 30 min,缓慢加入 10%BSA 至其终浓度为 1%(质量浓度),继续搅拌 30 min。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 4 000 g 离心 10 min,将上清转移至另一离心管中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 12 000 g 离心 30 min,小心弃去上清。用 5 mL (即 1/10 原体积)PBS(pH7.0)重悬沉淀。加入 1%(质量浓度)的叠氮钠(NaN_3)溶液至终浓度为 0.02%,用试纸喷膜仪将胶体金溶液喷于 $300\times 5\text{ mm}$ 玻璃纤维棉上,速度为 $50\text{ }\mu\text{L}/\text{cm}$,并于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 真空抽干,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 干燥保存备用。

7.2 检测线和对照线的制备

用纯化的浓度为 2 mg/mL 的 PPRV N 蛋白和兔抗 SPG IgG 分别作为检测线和对照线试剂。用试纸喷膜仪将两种试剂分别点在硝酸纤维膜上,点样速度为 $0.75\text{ }\mu\text{L}/\text{cm}$ 。 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 干燥 2 h, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 密封保存备用。

7.3 试纸卡的组装

按图 B.1 所示,将背衬、样品垫、吸水垫、硝酸纤维膜、金标垫粘在一起,并用试纸条切割机将其切成 3.5 mm 宽的试纸条,将试纸条放入试纸卡中,将试纸卡放入含有干燥剂的密封袋内,密封后于 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

8 样品采集、处理和保存

采集动物血样,室温静置约 30 min,使血液自然凝固。 $5\text{ }000\text{ g}$ 离心 10 min,收集上清液转移至另一离心管中,于 $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中作用 30 min 后,待血清样品恢复室温后用于检测。血清样品也可放 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 暂时保存(不超过 7 d)或 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 长期保存。样品的运输按 SN/T 2123 执行。

9 样品检测

9.1 从 2℃~8℃ 冰箱中取出带包装的试纸卡,在室温放置约 30 min。

9.2 样品稀释,分别用样品稀释液(见附录 A)将 PPRV 阳性血清、PPRV 阴性血清和待检血清样品稀释 5 倍,即向 80 μL 稀释液加入 20 μL 血清,用加样器混匀。

9.3 打开试纸卡的密封包装袋,检查试纸卡是否正常。如试纸条已变形、变色或受潮则不能使用。

9.4 将试纸卡平放于操作台面,加样孔朝上,向加样孔中加入约 100 μL 5 倍稀释的血清样品,室温静置 5 min~20 min。整个检测过程在室温(20℃~25℃)进行。

10 结果判定

10.1 根据图 B.2 所示进行结果判定,如果对照线和检测线均显色,则为阳性;如果仅对照线显色,而检测线不显色,则为阴性;如果对照线不显色,则检测无效,应换用另一根试纸卡再次检测。

10.2 结果判定应在加样后 20 min 内进行。

11 商品化试纸卡检测

可使用等效商品化胶体金试纸卡检测 PPRV 血清抗体,按相关说明书进行检测和结果判定。

附 录 A
(规范性附录)
试剂配制

A.1 磷酸缓冲液(PBS)

氯化钠(NaCl)	8 g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	0.2 g
磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄)	2.9 g
氯化钾(KCl)	0.2 g
蒸馏水	1 000 mL

A.2 1%柠檬酸钠溶液

取柠檬酸三钠 1 g,加入 100 mL 蒸馏水中,充分振荡,使其完全溶解,并用 0.22 μm 滤膜过滤。该溶液需用现配。

A.3 1%碳酸钾溶液

取柠檬酸钾 1 g,加入 100 mL 蒸馏水中,充分振荡,使其完全溶解,并用 0.22 μm 滤膜过滤。该溶液需用现配。

A.4 10%BSA 溶液

取 1 g BSA 粉末,加入 10 mL 蒸馏水,充分振荡使其全部溶解,并用 0.22 μm 滤膜过滤。分装成 1 mL/管,于-70℃保存备用。

A.5 胶体金溶液的制备

采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液。向 99 mL 蒸馏水中加入 1 mL 1%氯金酸溶液,加热至沸腾,迅速加入 2.4 mL 新鲜配制的 1%(质量浓度)柠檬酸三钠溶液,并充分混匀,继续加热约 5 min~10 min,溶液颜色由蓝色变为红色即可。冷却至室温后,用 0.22 μm 滤膜过滤,分装后 4℃避光保存备用。

A.6 样品稀释液(含有 0.5%BSA 的 PBS)

向 100 mL PBS(见 A.1)中加入 0.5 g BSA 粉剂,混匀。

附 录 B
(规范性附录)
试纸条结构示意图和结果判定方法图

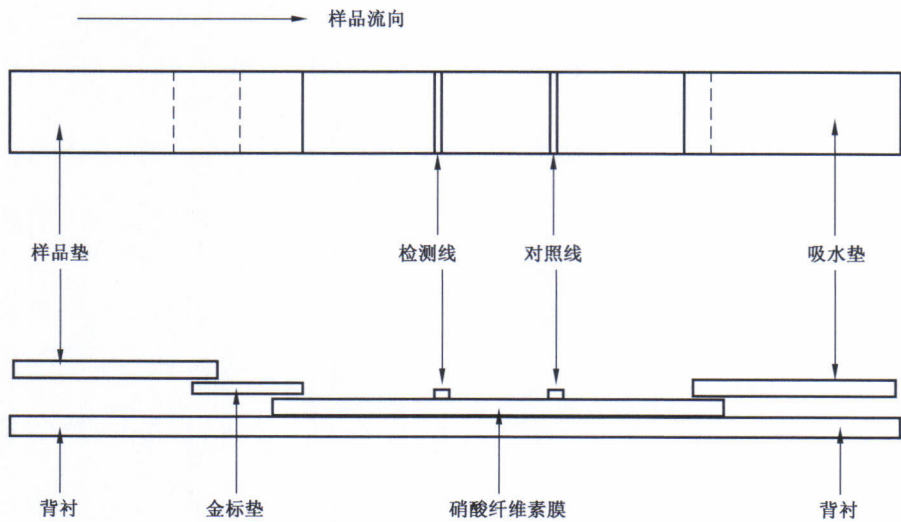


图 B.1 小反刍兽疫胶体金试纸条结构示意图

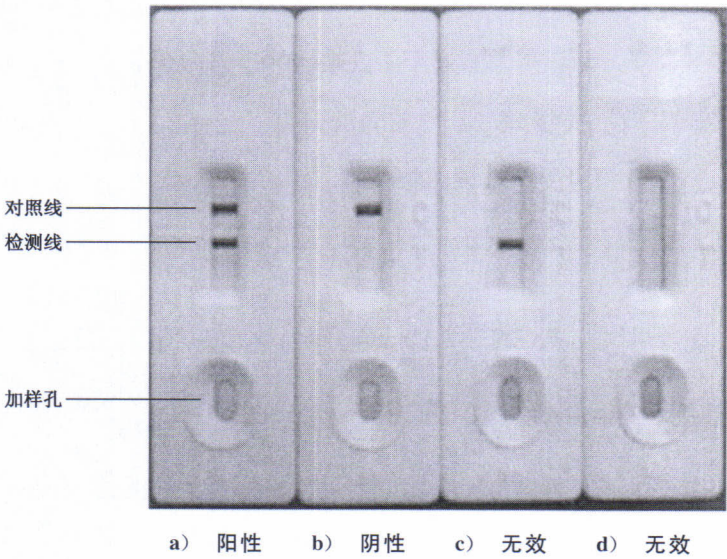


图 B.2 小反刍兽疫胶体金试纸卡检测结果判定示意图