

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1177—2003

---

### 猴 B 病毒相关抗体检测方法

Protocol of test for B virus related antibodies in monkey

2003-03-17 发布

2003-09-01 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。

本标准由中华人民共和国云南出入境检验检疫局负责起草。

本标准主要起草人：徐维加、董俊、周晓黎、徐自忠。

本标准系首次发布的检验检疫行业标准。

# 猴 B 病毒相关抗体检测方法

## 1 范围

本标准规定了猴 B 病毒相关抗体的检测方法。

本标准适用于猴 B 病毒相关抗体的检测。

## 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—1992 分析实验室用水规格和试验方法(eqv ISO 3696:1987)

## 3 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

### 3.1

CPE

致细胞病变作用。

### 3.2

TCID<sub>50</sub>

半数组织培养感染量。

### 3.3

玻片 EIA

玻片酶联免疫吸附试验。

### 3.4

SPA

葡萄球菌 A 蛋白。

### 3.5

HRP

辣根过氧化物酶。

## 4 原理

玻片 EIA 方法的基本原理是酶分子与抗体或抗原分子共价结合,此种结合不会改变抗体的免疫学特性,也不影响酶的生物学活性。此种酶可与吸附在固相载体上的抗原或抗体发生特异结合。滴加底物溶液后,底物可在酶作用下使其所含的供氢体由无色的还原型变成有色的氧化型,出现颜色反应。因此,可通过底物的颜色反应来判定有无相应的免疫反应,颜色反应的深浅与标本中相应抗体或抗原的量成正比。

## 5 试剂和材料

下列试剂除特殊规定外,均指分析纯试剂。

- 5.1 水:本标准所用水应符合 GB/T 6682—1992 中一级水的规格。
- 5.2 病毒:人单纯疱疹病毒 I 型(HSV-1)毒株,由指定单位提供。
- 5.3 血清:人单纯疱疹病毒 I 型阳性血清、阴性血清由指定单位提供。
- 5.4 被检血清。
- 5.5 细胞:Vero 传代细胞,由云南出入境检验检疫局提供。
- 5.6 SPA-酶(辣根过氧化物酶)(见第 A.2 章):由指定单位提供。
- 5.7 培养液:199 培养基中加入 10%无 HSV-1 抗体的胎牛血清(经 56 °C 30 min 灭活)含青霉素 200 IU/mL、链霉素 200 μg/mL。
- 5.8 维持液和稀释液:199 培养基中加入 2%无 HSV-1 抗体的胎牛血清(经 56 °C 30 min 灭活)含青霉素 200 IU/mL、链霉素 200 μg/mL。
- 5.9 细胞分散液、终止液、底物液、缓冲液(pH7.3)、0.25%胰酶等(见附录 A:第 A.5 章、第 A.1 章、第 A.4 章、第 A.3 章、第 A.6 章)。

## 6 器械和设备

- 6.1 倒置显微镜、普通显微镜、二氧化碳培养箱、冰箱(-20 °C 保存血清、-70 °C 保存种毒)。
- 6.2 玻片(印有 10~40 个小孔)、微量移液器(20 μL~200 μL)。

## 7 玻片 EIA

### 7.1 操作方法

- 7.1.1 抗原玻片制备:HSV-1 感染 Vero 细胞,出现“50%~75%”病变时弃去溶液加入少量 0.25%胰酶和 0.02%EDTA 各半进行消化,见细胞松散弃去消化液,用 PBS 洗一次,加入少量 PBS 吹打细胞使其分散均匀。将细胞液滴在玻片孔内,在显微镜下观察,细胞分散,浓度适中即可。待干,放入冷丙酮置 4 °C,15 min 取出吹干。同时制备正常细胞抗原,方法同上。涂好的玻片放入-30 °C 保存。保存期间需保持干燥。
- 7.1.2 SPA-HRP 的滴定:用涂好的玻片,滴加 1:10 的阳性血清于正常细胞和病毒细胞的孔内,另滴加阴性血清和 PBS 作对照。将酶结合物按一定的稀释度稀释,最后选择出现“+++~++++”最高稀释度为正式试验酶结合物的稀释度。

### 7.2 试验程序

- 7.2.1 将已准备好的涂有病毒细胞和正常细胞的玻片取出,待干,分别加上 1:5 稀释的待检血清及已知阳性、阴性血清和 PBS,滴好后将玻片放入湿盒,37 °C 保温 30 min。
- 7.2.2 取出玻片用洗液漂洗三次,每次浸泡 5 min,待干。
- 7.2.3 加酶结合物,放湿盒内保温 30 min。
- 7.2.4 用洗液漂洗三次,每次 5 min,待干。
- 7.2.5 将玻片放入底物液显色 5 min。
- 7.2.6 置水内洗一次,终止反应后,待干。

### 7.3 结果判定

首先看正常细胞孔的阳性血清孔、阴性血清孔、PBS 孔无色;病毒细胞孔的阴性血清孔、PBS 孔无色,阳性血清孔有色时才可判定结果。或者正常细胞孔略有颜色,而病毒细胞孔的颜色明显高于正常细胞孔也可判定结果。如果待检血清的正常细胞孔和病毒细胞孔颜色一样则不能判结果,则须重试或用其他方法确证。

阳性:有一定数量不同颜色的细胞;

阴性:无色。

**附 录 A**  
**(规范性附录)**  
**溶液配方**

A.1 终止液:2 mol/L 硫酸( $H_2SO_4$ )。

A.2 试剂:SPA-酶(辣根过氧化物酶)。

A.3 pH7.3 PBS:

磷酸二氢钠 ( $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ )	0.6 g
磷酸氢二钠 ( $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ )	5.8 g
水( $H_2O$ )	2 000 mL

A.4 底物液:

3,3-二氨基苯胺盐酸盐	40 mg
PBS (pH7.3)	100 mL
丙酮	5 mL
33%双氧水( $H_2O_2$ )	100 $\mu$ L

A.5 0.02%EDTA:

EDTA	0.2 g
PBS	1 000 mL

A.6 0.25%胰酶:

胰酶	0.25 g
PBS (pH7.6)	100 mL

---