



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1358.2—2005

马传染性贫血琼脂凝胶免疫 扩散试验操作规程

Protocol of agar gel immuno-diffusion test for equine infectious anaemia

2005-02-17 发布

2005-07-01 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。

本标准负责起草单位：中华人民共和国山东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：杨元杰、朱来华、吴华、韩光来。

本标准是首次发布的出入境检验检疫行业标准。

马传染性贫血琼脂凝胶免疫 扩散试验操作规程

1 范围

本标准规定了马传染性贫血琼脂凝胶免疫扩散试验操作规程。

本标准适用于马传染性贫血抗体水平的检测和诊断。

2 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

2.1

AGID Test: 琼脂免疫扩散试验。

2.2

EIA: 马传染性贫血。

3 原理

抗原和抗体的分子质量一般都在 2×10^5 U 以下, 抗原及其特异性抗体在凝胶中从高浓度区域向低浓度区域扩散时所受阻力很小, 基本上呈自由扩散形式。由于不同抗原分子质量、结构、形状和电荷量不同, 因此其扩散系数不同, 在凝胶中的扩散速度也不同。当抗原与相应抗体经扩散后在凝胶中相遇, 形成抗原抗体复合物, 若两者在相遇处比例适当, 则形成最大复合物。由于复合物分子质量大, 颗粒增大, 因此不再继续扩散而产生沉淀, 呈现出线状或带状, 其形成的线状或带状的“特异性屏障”称为免疫沉淀线或免疫沉淀带, 可根据抗原与阳性血清之间出现这种沉淀带, 抗原与被检血清之间是否出现沉淀带来判定被检血清中是否存在抗体。

4 试剂和材料

4.1 EIA AGID 抗原: 由指定单位提供。

4.2 标准阳性血清和标准阴性血清: 由指定单位提供。

4.3 受检血清: 按照常规方法采血分离血清。4℃冷藏保存。

4.4 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$): 分析纯。

4.5 磷酸二氢钾(KH_2PO_4): 分析纯。

4.6 氯化钠(NaCl): 分析纯。

4.7 无离子水。

4.8 硫柳汞: 分析纯。

4.9 琼脂糖: 分析纯。

5 器械和设备

5.1 培养箱。

5.2 平皿: 规格 90 mm×15 mm, 洁净灭菌。

5.3 外径 5.3 mm 打孔器(或薄壁型金属管)。

5.4 坐标纸。

5.5 分析天平。

5.6 三角烧瓶(250 mL~500 mL)。

5.7 200 μ L 可调微量移液器和吸嘴。

6 操作方法

6.1 制备琼脂板

6.1.1 按照附录 A 配制 PBS 缓冲液、1% 硫柳汞溶液。

6.1.2 取琼脂糖 1 g, 直接放入含有 0.01% 硫柳汞的 100 mL 的 PBS 缓冲液中, 水浴加热融化后, 待自然冷却至约 56℃ 时, 每个平皿中倒入 15 mL~18 mL 琼脂液, 厚度约 2.5 mm 左右, 注意不要产生气泡, 冷凝后加盖, 将平皿倒置, 防止水分蒸发, 放冰箱中冷藏保存, 一周内使用。

6.2 打孔

反应孔现用现打。在坐标纸上画好 7 孔图案, 把坐标纸放在带有琼脂板的平皿下面, 按照图案在固定位置上用金属管(或打孔器)打孔, 将切下的琼脂片取出, 勿使琼脂膜与玻璃面脱离, 为防止渗漏, 最好将打孔后琼脂底部经酒精灯火焰上方快速来回 5 次~7 次加热封底。共打 7 个孔, 周围等距离打 6 个孔, 孔距为 2.4 mm, 孔径为 5.3 mm(见图 1)。

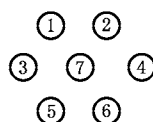


图 1 七孔板

6.3 加样

用微量移液器吸取抗原悬液滴加入中间孔(孔 7), 3、4 孔加入标准阳性血清, 1 孔、2 孔、5 孔、6 孔分别加入受检血清, 加满为止, 平皿加盖。待孔中液体吸干后, 将平皿倒置, 放湿盒内, 以防水分蒸发。置 15℃~30℃ 下反应, 在 24 h~48 h 后, 在强灯光暗背景下观察沉淀线。

7 结果判定

7.1 阳性: 标准阳性血清孔与抗原孔之间只有一条明显致密的沉淀线, 受检血清孔与抗原孔之间形成一条沉淀线; 或者阳性血清的沉淀线末端向毗邻的受检血清的抗原侧偏弯者, 受检血清可判定为阳性。

7.2 阴性: 受检血清与抗原孔之间不形成沉淀线, 或标准阳性血清孔与抗原孔之间的沉淀线向毗邻的受检血清孔直伸或向受检血清孔侧偏弯者, 可判定为阴性。

7.3 可疑: 标准阳性血清孔与抗原孔之间的沉淀线末端, 似乎向毗邻受检血清孔内侧偏弯, 但不易判定时, 可将抗原稀释 2 倍、4 倍、6 倍、8 倍进行复试, 重检结果相同应判为阳性。观察可延至 5 d。

附 录 A
(规范性附录)
试 剂 配 制

A.1 pH 7.4 的 0.01 mol/L 磷酸缓冲生理盐水(PBS)

磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2.9 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.3 g
氯化钠(NaCl)	8.0 g
无离子水定容至	1 000 mL

A.2 1%的硫柳汞溶液

硫柳汞	1.0 g
无离子水定容至	100 mL

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
马传染性贫血琼脂凝胶免疫
扩散试验操作规程
SN/T 1358.2—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

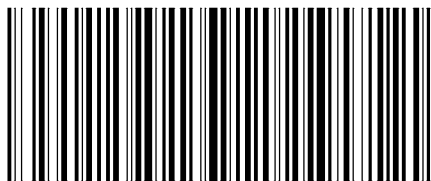
*

开本 880×1230 1/16 印张 0.5 字数 4 千字
2005年5月第一版 2005年5月第一次印刷

*

书号: 155066·2-16210 定价 6.00 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 1358.2-2005