|  |  |
| --- | --- |
| ICS | 65.020.30 |
| CCS | B 45 |

|  |
| --- |
| 2201 |

长春市地方标准

DB 2201/T XXXX—2023

梅花鹿布鲁氏菌病胶体金免疫层析检测方法

Specification for the detection of colloidal gold test strips for sika deer brucellosis

（本草案完成时间：2023-4-1）

2023 - XX - XX发布

2024 - 3 - XX实施

长春市市场监督管理局  发布

1. 前言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由长春市畜牧业管理局归口。

本文件起草单位：长春市乾艺生物科技研究院、吉林省畜牧兽医科学研究院、长春市农业科学院。

本文件主要起草人：田来明、权心娇、田贺实、赫雪、田怡豪、王凯立、王向辉、尚丽元、高启臣、张鸿、赵春梅。

梅花鹿布鲁氏菌病胶体金免疫层析检测方法

* 1. 范围

本文件规定了梅花鹿布鲁氏菌病胶体金免疫层析试纸条的制备、样品检测、结果判定的要求。

本文件适用于梅花鹿布鲁氏菌病胶体金免疫层析试纸条的制备。

* 1. 规范性引用文件

下列文件中是应用本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件;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 40369-2021 免疫层析试纸条检测通则

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

* 1. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

鹿布鲁氏菌病

由布鲁氏菌（Brucella）引起的人畜共患性传染病，是我国乙类传染病，母鹿感染后主要表现为妊娠期流产，或产死胎、弱仔等；公畜感染后主要表现为睾丸炎、附睾炎、睾丸肿大等。

* 1. 仪器设备

三维喷点平台，定量喷液范围20nl~2μL，最小划线喷量0.1μL/sec。

加热磁力搅拌器，可调节加热盘。

紫外分光光度计，200nm~1000nm。

高速冷冻离心机，最高转速18000r/min。

精密可程式烘箱，25~80℃。

切条机，最小切割宽度1mm。

* 1. 耗材

硝酸纤维素膜

玻璃纤维素膜

吸水纸

样品垫

PVC底板

精密PH试纸

* 1. 试剂

1%氯金酸溶液，见表A.1。

1%柠檬酸三钠溶液，见表A.2。

鹿脂多糖（LPS）抗原，见附录B。

胶体金溶液，见附录C。

胶体金探针溶液，见附录D。

羊抗兔IgG，兔抗鹿IgG应符合国家标准。

90%（V/V）苯酚溶液，见表A.3。

含1%饱和醋酸钠的冷甲醇，见表A.4。

重悬液，表A.5。

布鲁氏菌病阴性标准血清、阳性标准血清符合国家标准。

* 1. 样品处理

采集血样于EP管中，管上标记好鹿只编号，将EP管放入装有冰袋的保温箱中保存。不同鹿场样品需贴好标签，写明鹿场名称、采集地点、采集时间等信息。血样3000rpm离心5min获得血清，暂不检测的样品于-80℃保存。

* 1. 操作步骤

制备金标垫，稀释胶体金探针至5 OD/ul，室温且湿度20~40％条件下，将溶液用三维喷点平台喷到胶体金垫上，压力设置为10 PSI，喷点参数为 2~6 ul/cm。

将制备好的金标垫置于湿度20%，37℃条件下干燥，干燥后密封储存待用。

使用切条机将金标垫均匀切割成长0.8cm条带，金条带两端边缘弃除。

制备硝酸纤维素膜，将硝酸纤维素膜室温下平衡1小时。

将LPS抗原稀释至0.125mg/ml，羊抗兔IgG稀释至1mg/ml使用三维喷点平台，设定喷点量为1ul/cm，点样。

将制备好的硝酸纤维素膜于湿度20%，37℃条件下干燥，干燥后密封储存待用。

使用切条机将硝酸纤维素膜均匀切割成长2.5cm条带。

撕掉PVC底板聚酯背衬，将、硝酸纤维素膜按照划线指示位置粘贴在PVC底板上。

将吸水纸切割成长1.6cm条带粘贴在硝酸纤维素膜上，与硝酸纤维素重叠。

将金标垫粘贴在硝酸纤维素膜下端，金标垫覆盖硝酸纤维素膜2mm，

将样品垫切割成长1.7cm条带粘贴在金标垫下端，覆盖金标垫2mm。

粘贴完成后，用切条机裁剪成为0.5cm宽的试纸条。

组装上试纸条外壳塑料卡，组装完成后与一次性滴管、干燥剂一起封装在袋中，室温干燥保存。

* 1. 样品检测

检测前设置阴性对照、阳性对照，阴性、阳性样品应采用国家级标准物质。

室温下检测，样品稀释后，用一次性滴管向加样孔内垂直滴入3滴待测样品。

加样后水平放置，等待15min读取检测结果，20min后读取结果无效。

* 1. 结果判定

阳性：出现两条红色条带，一条位于检测线（T线）、一条位于质控线（C线），检测线（T线）红色条带无论深浅，均视为阳性结果。

阴性：仅在质控线（C线）处出现一条红色条带。

无效：质控线（C线）未出现红色条带，无论检测线（T线）是否出现红色条带均视为无效结果，需重新检测。

附录A

（规范性附录）

相关试剂的配制

1%氯金酸溶液，避光条件下配制，见表A.1。

表A.1

|  |  |
| --- | --- |
| 氯金酸 | 1g |
| 去离子水 | 100ml |

1%柠檬酸三钠溶液，见表A.2。

表A.2

|  |  |
| --- | --- |
| 柠檬酸三钠 | 1g |
| 去离子水 | 100ml |

90%（V/V）苯酚溶液，见表A.3。

表A.3

|  |  |
| --- | --- |
| 苯酚 | 450ml |
| 去离子水 | 50ml |

含1%饱和醋酸钠的冷甲醇，见表A.4。

表A.4

|  |  |
| --- | --- |
| 醋酸钠 | 32g |
| 冷甲醇 | 400ml |
| 去离子水 | 100ml |

重悬液，见表A.5。

表A.5

|  |  |
| --- | --- |
| PEG20000 | 1ml |
| Tween-20 | 0.1ml |
| 蔗糖 | 2.5ml |
| TBS缓冲液 | 46.4ml |

附录B

（规范性附录）

LPS抗原的提取

LPS抗原提取步骤为：

1. 湿重50g布鲁氏菌重悬于170ml无菌蒸馏水，85℃水浴3h。
2. 待菌液冷却至66℃时，加入预热到的66℃ 90%(V/V）苯酚溶液190ml，66℃下搅拌15min。
3. 将菌液移至离心管中，4℃ 10000xg离心15min。
4. 吸取离心管下层酚相，滤纸过滤细胞碎片，加入500ml含1%饱和醋酸钠的冷甲醇溶液，4℃沉淀2h。
5. 弃上清，沉淀中加入80ml无菌蒸馏水，4℃条件下搅拌18h。
6. 将溶液转移至离心管中，4℃ 10000xg条件下离心10min。
7. 离心后收集上清记为上清1，保存于4℃，沉淀中加入80ml无菌蒸馏水，4℃搅拌2h。
8. 将上述溶液转移至离心管，4℃ 10000xg离心10min，离心后收集上清记为上清2。
9. 将上清1、2混合，加入8g三氯乙酸，室温搅拌10min，4℃ 10000xg离心15min。
10. 上述溶液4℃ 10000xg离心15min，收集上清。
11. 处理透析袋后用蒸馏水透析，共透析4次每次3h。
12. 收集透析后溶液，向溶液中加入DNA、RNA酶至终浓度为0.015mg/ml，37℃ 24h。
13. 加入蛋白酶K至终浓度为0.015mg/ml，55℃ 3h，冷却后室温过夜。
14. 重复透析步骤，经冷冻干燥机冷冻后即得LPS样品，样品于-20℃保存。

附录C

（规范性附录）

胶体金溶液的制备

胶体金溶液制备的步骤为：

1. 将制备所需玻璃器皿洗净后于酸缸中浸泡24h，泡酸后用去离子水洗净，烘干箱70℃烘干，锡纸封口备用。
2. 处理后的锥形瓶中加入 300 mL 去离子水，置于磁力搅拌器上。启动磁力搅拌器，向锥形瓶中加入3 mL1%氯金酸溶液，室温下搅拌10min。
3. 将溶液加热至沸腾，一次性快速加入5ml 1%柠檬酸钠溶液，溶液由淡黄色转至灰黑色，灰黑色转至深红色，最后由深红色转变为酒红色。
4. 待溶液成稳定的酒红色后，继续加热5~10 min，冷却室温。
5. 配制好的胶体金溶液避光保存于 4℃冰箱。

附录D

（规范性附录）

胶体金探针的制备

胶体金探针制备的步骤为：

1. 将制备所需的锥形瓶泡酸处理。
2. 锥形瓶中加入50ml胶体金溶液，PH调至8.6。
3. 逐滴加入兔抗鹿IgG至终浓度为20μg/mL，室温充分搅拌。
4. 溶液中加入终浓度为5%的10% BSA溶液。
5. 将溶液移至离心管中，2000rpm离心20min。
6. 弃沉淀，上清液12000rpm离心30min。
7. 弃上清，加入原体积10%的重悬液重悬沉淀，离心步骤重复2次。

