ICS 11.220

B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA X45—2019

猪繁殖与呼吸综合征病毒免疫酶组织化学法检测方法

Immunohistochemistry (IHC) for diagnosis of porcine reproductive and respiratory virus syndrome

（征求意见稿）

中国兽医协会 CVMA

2019 - XX - XX 发布　　2019 - XX - XX 实施

中　国　兽　医　协　会　发布

前　　言

本标准按 GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准不涉及专利。

本标准由中国兽医协会提出并归口。

本标准起草单位：中国动物疫病预防控制中心。

本标准主要起草人：李晓霞、王睿男、宋晓晖、王传彬、亢文华、刘颖昳、张硕、顾小雪、周智、原霖、杨林。

中国兽医协会
CVMA

猪繁殖与呼吸综合征病毒免疫酶组织化学法检测方法

1 范围

本标准规定了猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原的免疫酶组织化学检测方法。

本标准适用于猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原的检测。

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 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T14926.55-2001 实验动物 免疫酶组织化学法

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

3 缩略语

Immunohistochemistry(IHC)：免疫酶组织化学法

Porcine productive and respiratory syndrome(PRRSV)：猪繁殖与呼吸综合征病毒

4 原理

用已知的特异性抗体与标本中待测抗原反应，如待测抗原是特异性抗体的相应抗原则形成抗原抗体复合物。此抗原抗体复合物仍保持其抗原活性，可与相应的第二抗体酶结合物结合，遇酶底物产生颜色反应。在普通显微镜下，根据颜色的反应判定结果。

5 材料准备

5.1 器材与设备

切片机、恒温培养箱、显微镜、微量移液器及配套吸头、保湿盒、稀释槽、载玻片、盖玻片、1.5mL离心管、染色缸。

5.2 试剂

5.2.1 10%-20%甲醛固定液，10mL-20mL 的甲醛溶液加水至 100mL。

5.2.2 1％盐酸酒精，1mL 盐酸溶液加 75%的酒精至 100mL。

5.2.3 3%H2O 溶液。

5.2.4 PH7.2 PBS 溶液，参见附录 A.1。

5.2.5 PH7.3 PBS 溶液，参见附录 A. 2。

5.2.6 5%正常马血清，5mL 正常马血清加 PH7.3 PBS 至 100mL。

5.2.7 PRRS 单抗。

5.2.8 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗。

5.2.9 苏木素染色液，参见附录 A.3。

5.2.10 水溶性封片剂（GVA）。

5.2.11 AEC 显色剂。

5.2.12 DAB 显色剂。

5.3 样品

被检组织采集好后立即加入10~20%的甲醛溶液中固定，组织应新鲜无自溶。建议采集病猪的肺脏、扁桃体、淋巴结、脾脏、肝脏、肾脏等有病变的组织脏器，将样品制作成石蜡切片并贴在组化专用或粘合剂处理过的载玻片上（载玻片处理方法参见附录A.4），37℃温箱过夜，-20℃保存，备用。

6 操作步骤

6.1 脱蜡 组织切片常规脱蜡至 1％盐酸酒精，反应 20min。

6.2 洗涤 将切片放入染色缸中，用蒸馏水洗 3 次，每次 3min。

6.3 抑制内源酶

组织切片浸入3％H_2O_2溶液中 20min，必要时再用1％盐酸酒精作用10min。

6.4 洗涤 将切片放入染色缸中，用蒸馏水洗 3 次，每次 3min。。

6.5 孵育 切片加 0.5％胰酶消化， 放入湿盒 37℃温箱孵育 3min。

6.6 洗涤 将切片放入染色缸中，用 PH7.2 PBS 洗 3 次，每次 3min。

6.7 封闭 切片加 5%正常马血清 37℃温箱中孵育 20min。

6.8 单抗孵育

切片加上用 PH7.3 PBS 适当稀释的 PRRSV 单抗，于 37℃温箱中孵育 1h，对照片省去一抗，或采用 37℃温箱孵育 40min 后，放 4℃冰箱过夜。

6.9 洗涤 PH7.2 PBS 洗 3 次，每次 3min。

6.10 二抗

切片加上用 PH7.3 PBS 1:100 倍稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗，于 37℃温箱中孵育 1h。

6.11 洗涤 将切片放入染色缸中用 PH7.2 PBS 洗 3 次，每次 3min。

6.12 显色 将切片置于湿盒中，加配制好的 AEC 或 DAB 显色剂显色，时间 3-7min，以显微镜下观察染色效果，控制染色终止时间。

6.13 洗涤 将切片放入染色缸中，用 PH7.2 PBS 洗 3 次，每次 3min。

6.14 衬染 1：10 倍稀释的苏木素染色液染色 10～30 秒，也可显微镜下控制染色效果。

6.14 洗涤 将切片放入染色缸中用自来水冲洗 3min。

6.15 封片

使用 AEC 染色剂显色的切片待切片自然干燥后用水溶性封片剂（GVA）进行封片。

使用 DAB 染色的切片衬染结束后用无水乙醇脱水 10min，二甲苯透明 10min（可以适当延长时间），用中性树胶进行封片。

7 结果判定

用显微镜观察，阴性片本底清晰，背景无非特异着染，阳性片组织细胞胞核呈红色或棕褐色（AEC 染色结果呈红色，DAB 染色显色结果呈棕褐色）着染，通常阳性反应见于变性、坏死的细胞胞浆或胞膜上，偶见胞核呈红色着染，即可判为猪繁殖与呼吸综合征抗原阳性。

8 注意事项

8.1 组织切片及所有试剂均应按组织切片和试剂保存要求进行保存，使用前恢复至室温。

8.2 一抗反应结束后可 4℃过夜。

8.3 在操作过程中动作要快，避免组织片变干。

8.4 显色时应保持切片处于避光的环境。

8.5 衬染时环境温度高衬染时间短一点，温度低时衬染时间适当延长

8.6 H_2O_2、显色液对眼睛、皮肤及呼吸道有刺激性作用，使用过程应注意防护，防止直接接触和吸入。H_2O_2应避光保存。

中国兽医协会
CVMA

附录 A

（资料性附录）

溶液的配置

A.1 PH值7.2 PBS

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	5.8g
$NaH_2PO4 \cdot 2H_2O$	0.6g
NaCI	17.0g
蒸馏水	加至2000mL

A.2 PH值7.3PBS

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	2.89g
KH_2PO_4	0.2g
NaCI	8.0g
KCI	0.2g
蒸馏水	加至1000mL

A.3 苏木素染色液

苏木素染色液的配方较多，有 Harris 苏木素液、Mayer 苏木素液、Ehrlich 苏木素液、Delafield 苏木素液等，常用的苏木素液为 Mayer 苏木素液，也可购买商品化的苏木素液。

Mayer 苏木素液：蒸馏水 700mL 加热，加入苏木素 5g 溶解，加入硫酸铝钾 44g，摇动助溶，升温至 80℃(多在 80 时加入硫酸铝钾)，加入碘酸钠 0.5g，煮沸 3-5 分钟，冷却（放置一晚）加入甘油 280mL，加冰醋酸 20mL（也可以不加），混匀即可使用。配好苏木素染液不宜放置时间太长，长时间放置会有结晶析出（尤其注意夏天过去的一段时间），导致染色能力不强。

A.4 组化用载玻片的处理方法

中国兽医协会 CVMA

载玻片前期处理：将新开封的载玻片泡在重铬酸钾浓硫酸中浸泡 24 小时（重铬酸钾浓硫酸配方：重铬酸钾：120g ;98%浓硫酸：200mL; 水：1000mL），自来水流水冲洗 12 小时，烘干，在 100%酒精中浸泡 6 小时，用干净的纱布将载玻片擦净并晾干备用。

载玻片的处理是做好免疫组化染色的重要步骤，尤其对一些需做酶消化、微波或高压处理、PCR 扩增的组织切片更为重要，可以选择购买商品化的组化专用载玻片，也可以选择自己制备组化用载玻片，目前常用的防脱片处理方法主要有以下两种：

APES（3-氨丙基三乙氧硅烷）：用丙酮将 APES 配成 2%浓度的工作液。将前期处理过的载玻片浸泡在 2%APES 中 10 秒，丙酮浸泡 2 分钟，蒸馏水冲洗 1 分钟，37℃烘干备用。

多聚左旋赖氨酸：蒸馏水配制 0.1%(ω/υ)多聚左旋赖氨酸浓缩液（室温可保存一年），使用时将浓缩液稀释 10 倍，将前期处理过的载玻片浸泡在 0.01%(ω/υ)的多聚左旋赖氨酸溶液中 15 秒，取出沥干，37℃烘干备用。

中国兽医协会
CVMA