



中华人民共和国国家标准

GB/T 18648—2020
代替 GB/T 18648—2002

非洲猪瘟诊断技术

Diagnostic techniques for African swine fever

2020-12-14 发布

2020-12-14 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

目 次

前言 V

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 缩略语 1

4 生物安全措施 1

5 临床诊断 1

 5.1 易感动物和宿主 1

 5.2 临床表现 2

 5.3 病理变化 2

 5.4 临床诊断结果判定 2

6 实验室诊断样品采集及处理 2

 6.1 试剂 2

 6.2 采样用具 2

 6.3 样品采集 2

 6.4 样品处理 3

7 普通 PCR 方法 3

 7.1 试剂 3

 7.2 仪器设备 3

 7.3 引物序列 4

 7.4 试验程序 4

 7.5 试验成立条件 4

 7.6 普通 PCR 结果判定 5

8 荧光 PCR 方法 5

 8.1 试剂 5

 8.2 仪器设备 5

 8.3 引物和探针 5

 8.4 试验程序 5

 8.5 试验成立条件 6

 8.6 荧光 PCR 结果判定 6

9 荧光 RAA 方法 6

 9.1 试剂 6

 9.2 仪器设备 6

 9.3 引物 6



9.4 试验程序 6

9.5 试验成立条件 7

9.6 荧光 RAA 结果判定 7

10 高敏荧光免疫分析法..... 7

10.1 试剂 7

10.2 仪器设备 7

10.3 试验程序 8

10.4 高敏荧光免疫分析结果判定 8

11 夹心 ELISA 抗原检测方法 9

11.1 试剂 9

11.2 仪器设备 9

11.3 试验程序 9

11.4 试验成立条件 10

11.5 夹心 ELISA 抗原检测结果判定 10

12 间接 ELISA 抗体检测方法..... 10

12.1 试剂 10

12.2 仪器设备 10

12.3 试验程序 10

12.4 试验成立条件 11

12.5 间接 ELISA 抗体检测结果判定 11

13 阻断 ELISA 抗体检测方法..... 12

13.1 试剂 12

13.2 仪器设备 12

13.3 试验程序 12

13.4 阻断率计算方法 13

13.5 试验成立条件 13

13.6 阻断 ELISA 抗体检测结果判定 13

14 夹心 ELISA 抗体检测方法..... 13

14.1 试剂 13

14.2 仪器设备 14

14.3 试验程序 14

14.4 试验成立条件 15

14.5 夹心 ELISA 抗体检测结果判定 15

15 间接免疫荧光方法 15

15.1 试剂 15

15.2 仪器设备 16

15.3 试验程序 16

15.4 试验成立条件 16

15.5 间接免疫荧光结果判定 17

16 综合判定 17

附录 A（规范性附录） 样品保存液的配制方法 18

附录 B（规范性附录） 聚合酶链式反应溶液的配制方法 19

附录 C（规范性附录） 酶联免疫吸附试验溶液的配制方法 20



前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 GB/T 18648—2002《非洲猪瘟诊断技术》，与 GB/T 18648—2002 相比，除编辑性修改外，主要技术变化如下：

- 增加了缩略语(见第 3 章)；
- 增加了生物安全措施(见第 4 章)；
- 增加了临床诊断(见第 5 章)；
- 增加了实验室诊断样品采集及处理(见第 6 章)；
- 增加了荧光 PCR 方法(见第 8 章)、荧光 RAA 方法(见第 9 章)、高敏荧光免疫分析法(见第 10 章)、夹心 ELISA 抗原检测方法(见第 11 章)、阻断 ELISA 抗体检测方法(见第 13 章)、夹心 ELISA 抗体检测方法(见第 14 章)、间接免疫荧光方法(见第 15 章)等实验室诊断方法；
- 增加了综合判定(见第 16 章)；
- 增加了样品保存液的配制方法(见附录 A)、聚合酶链式反应溶液的配制方法(见附录 B)；
- 修改了酶联免疫吸附试验溶液的配制方法(见附录 C, 2002 年版的附录 C)。

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这些专利的责任。

本标准由中华人民共和国农业农村部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位：中国动物卫生与流行病学中心。

本标准主要起草人：吴晓东、李林、胡永新、樊晓旭、邹艳丽、任炜杰、张永强、戈胜强、王清华、李金明、包静月、赵永刚、徐天刚、李岭、刘珊、蒋正军、王树双、马洪超、王志亮。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

- GB/T 18648—2002。

非洲猪瘟诊断技术

1 范围

本标准规定了 ASF 的临床诊断,实验室诊断样品采集及处理,以及普通 PCR 方法、荧光 PCR 方法、荧光 RAA 方法、高敏荧光免疫分析法、夹心 ELISA 抗原检测方法、间接 ELISA 抗体检测方法、阻断 ELISA 抗体检测方法、夹心 ELISA 抗体检测方法、间接免疫荧光方法等实验室诊断方法。

本标准适用于家猪和野猪 ASF 的诊断与监测。

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

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

ASF:非洲猪瘟(African Swine Fever)

ASFV:非洲猪瘟病毒(African Swine Fever Virus)

DEPC:焦碳酸二乙酯(Diethy Pyrocarbonate)

EDTA:乙二胺四乙酸(Ethylenediaminetetraacetic Acid)

ELISA:酶联免疫吸附试验(Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

FAM:6-羧基荧光素(6-Carboxy-Fluorescein)

OD:光密度(Optical Density)

PBS:磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline)

PCR:聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction)

RAA:重组酶介导的等温核酸扩增技术(Recombinase Aided Amplification)

SPF:无特定病原体(Specific Pathogen Free)

TMB:四甲基联苯胺(3,3',5,5'-Tetramethyl-Benzidine)

4 生物安全措施



进行 ASF 实验室诊断时,如样品处理、核酸提取等,应按照 GB 19489 执行。

5 临床诊断

5.1 易感动物和宿主

猪科动物是 ASFV 的易感动物。家猪和欧亚野猪对 ASFV 高度易感,且表现出相似的临床症状和死亡率;而非洲野猪,例如疣猪、丛林猪、红河猪和巨林猪,感染 ASFV 后很少或者不出现临床症状,是

病毒的储存宿主。

5.2 临床表现

5.2.1 最急性:无明显临床症状突然死亡。

5.2.2 急性:体温可高达 42 °C,沉郁,厌食,耳、四肢、腹部皮肤有出血点,可视黏膜潮红、发绀。眼、鼻有黏液脓性分泌物;呕吐;便秘,粪便表面有血液和黏液覆盖;或腹泻,粪便带血。共济失调或步态僵直,呼吸困难,病程延长则出现瘫痪、抽搐等其他神经症状。妊娠母猪流产。病死率可达 100%。病程 4 d~10 d。

5.2.3 亚急性:临床症状与急性相同,但病情较轻,病死率较低。体温波动无规律,一般高于 40.5 °C。仔猪病死率较高。病程 5 d~30 d。

5.2.4 慢性:波状热,呼吸困难,湿咳。消瘦或发育迟缓,体弱,毛色暗淡。关节肿胀,皮肤溃疡,跛足。死亡率低。病程 2 个月到 15 个月。

5.3 病理变化

典型的病理变化包括浆膜表面充血、出血,肾脏、肺脏表面有出血点,心内膜和心外膜有大量出血点,胃、肠道黏膜弥漫性出血;胆囊、膀胱出血;肺脏肿大,切面流出泡沫性液体,气管内有血性泡沫样黏液;脾脏肿大,易碎,呈暗红色至黑色,表面有出血点,边缘钝圆,有时出现边缘梗死;颌下淋巴结、腹腔淋巴结肿大,严重出血。最急性型的个体可能不出现明显的病理变化。

5.4 临床诊断结果判定

易感动物出现上述临床症状和病理变化,可初步判定为疑似 ASF 病例。

6 实验室诊断样品采集及处理

6.1 试剂

6.1.1 0.1 mol/L PBS(pH 7.4),配制方法见附录 A 的 A.1。

6.1.2 0.04 mol/L PBS(pH 7.4),配制方法见 A.2。

6.1.3 50%甘油-PBS 保存液,配制方法见 A.3。

6.1.4 青霉素,浓度为 10 000 IU/mL。

6.1.5 链霉素,浓度为 10 000 μg/mL。

6.2 采样用具

6.2.1 器械:解剖刀、剪刀、镊子、骨锯、注射器及针头、组织匀浆器等。

6.2.2 容器:真空采血管(含 EDTA 抗凝剂)、离心管(2 mL、10 mL)、样品保存管等。

6.2.3 个人防护用具:防护服、防护镜、防护帽、防护靴、口罩、一次性手套等。

6.2.4 采样记录用品:采样单、记号笔、防水标签等。

6.2.5 其他:医用棉签、医用纱布、封口膜、冰袋等。

6.3 样品采集

6.3.1 口鼻拭子采集

采集病死猪或发病猪、同群猪的口鼻拭子样品。用医用棉签在口腔或鼻腔转动至少 3 圈,采集口腔、鼻腔的分泌物;蘸取分泌物后,立即将拭子浸入 1 mL 50%甘油-PBS 保存液中,剪去露出部分,盖紧

离心管盖,密封后冷藏或冷冻保存。

6.3.2 全血样品采集

在发病猪群中,使用真空采血管(含 EDTA 抗凝剂)采集一定数量发病猪、同群猪全血各 5 mL,密封后冷藏或冷冻保存。

6.3.3 血清样品采集

在每一发病猪群中,采集发病猪、同群猪全血各 5 mL,室温放置 12 h~24 h,分离血清,装入离心管中,密封后冷藏或冷冻保存。

6.3.4 组织样品采集

采集病死猪或扑杀发病猪的组织样品。首选脾脏,其次为扁桃体、淋巴结、肾脏、骨髓等。脾脏、肾脏采集约 3 cm×3 cm 大小,扁桃体整体采集,淋巴结选取出血严重的整体采集,骨髓采集长度约 3 cm。将所采集样品放入 50%甘油-PBS 保存液中。

6.4 样品处理

6.4.1 口、鼻拭子样品处理

口、鼻拭子标记样品编号,立即进行 ASF 病原检测或冷冻储存备用。

6.4.2 全血样品处理

全血标记样品编号,立即进行 ASF 病原检测或冷冻储存备用。

6.4.3 血清样品处理

血清标记样品编号,立即进行 ASFV 抗体检测或冷冻储存备用。

6.4.4 组织样品处理

取适量采集的组织样品置于组织匀浆器中充分研磨,加入终浓度为 1 000 IU/mL 的青霉素、1 000 μg/mL 的链霉素,灭菌的 0.1 mol/L PBS(pH 7.4)制备 10%组织匀浆液。2 000 r/min 离心处理 10 min。取上清液,标记编号,立即进行 ASF 病原检测或冷冻储存备用。

7 普通 PCR 方法

7.1 试剂

7.1.1 DNA 提取试剂盒。

7.1.2 PCR 预混液(2×): *Taq* DNA 聚合酶(0.05 U/μL),反应缓冲液,4 mmol/L MgCl₂ 以及 0.4 mmol/L 的 dNTP。

7.1.3 无核酸酶水,配制方法见附录 B 的 B.1。

7.1.4 TAE 缓冲液,配制方法见 B.2 和 B.3。

7.1.5 2%的琼脂糖凝胶,配制方法见 B.4。

7.1.6 6×上样缓冲液。

7.2 仪器设备

7.2.1 自动化核酸提取仪。

7.2.2 PCR 扩增仪。

7.2.3 台式低温高速离心机(最大离心力 12 000 g 以上)。

7.2.4 稳压稳流电泳仪和水平电泳槽。

7.2.5 凝胶成像仪(或紫外透射仪)。

7.2.6 微量可调移液器(2.5 μL 、10 μL 、100 μL 、200 μL 、1 000 μL 等不同规格)。

7.2.7 无核酸酶离心管与吸头。

7.2.8 PCR 扩增管。

7.3 引物序列

引物针对 ASFV B646L 基因的保守区域设计。上游引物 PPA-1: 5'-AGTTATGGGAAAC-CCGACCC-3'; 下游引物 PPA-2: 5'-CCCTGAATCGGAGCATCCT-3'。扩增产物大小为 257 bp。

7.4 试验程序

7.4.1 核酸提取

采用 DNA 提取试剂盒提取各类样本中的病毒核酸,或用自动化核酸提取仪提取各类样本中的病毒核酸。如在 2 h 内检测可将提取的核酸置于冰上保存,否则应置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

每次抽提核酸,应至少包括一个阳性对照和一个阴性对照。阳性对照样品应为 ASFV 核酸阳性样本(血清、全血、10%组织匀浆或细胞培养上清液);阴性对照样品应为无核酸酶水或者 ASFV 核酸阴性样本(血清、全血、10%组织匀浆或细胞培养上清液)。

7.4.2 核酸扩增

7.4.2.1 扩增体系

每个样品配制 22 μL PCR 反应混合液,组成如下:

无核酸酶水	7.5 μL
PCR 预混液(2 \times)	12.5 μL
PPA-1(10 $\mu\text{mol/L}$)	1 μL
PPA-2(10 $\mu\text{mol/L}$)	1 μL

将 22 μL PCR 反应混合液加入每个 0.2 mL PCR 扩增管;将 3 μL DNA 模板加入 PCR 扩增管中。每次进行普通 PCR 扩增时均应设立阳性、阴性及空白对照。阳性对照应用阳性对照样品所提取核酸作为模板,阴性对照应用阴性对照样品所提取核酸作为模板,空白对照应用无核酸酶水作为模板。加入模板后,密封反应管,瞬时离心。将所有 PCR 扩增管放在 PCR 仪中。按 7.4.2.2 条件运行扩增程序。

7.4.2.2 扩增条件

95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,62 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,40 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 7 min。

7.4.2.3 PCR 扩增产物电泳

将 5 μL 的 6 \times 上样缓冲液加入 PCR 产物中,混匀后取 8 μL 加入到使用 1 \times TAE 缓冲液配制的 2% 琼脂糖凝胶中,电泳 30 min~40 min。电泳结束后,将琼脂糖凝胶置于凝胶成像仪中观察结果。

7.5 试验成立条件

阳性对照应有大小为 257 bp 的特异性扩增条带,且阴性对照和空白对照应无任何扩增条带。

7.6 普通 PCR 结果判定

符合 7.5 的条件,被检样品有大小为 257 bp 的特异性扩增条带,且与阳性对照条带分子量大小相符,则该样品判为 ASFV 核酸阳性;被检样品无特异性的扩增条带,则判为 ASFV 核酸阴性。

8 荧光 PCR 方法

8.1 试剂

8.1.1 DNA 提取试剂盒。

8.1.2 无核酸酶水,配制方法见 B.1。

8.1.3 荧光 PCR 预混液(2×)。

8.2 仪器设备

8.2.1 荧光 PCR 扩增仪。

8.2.2 台式低温高速离心机(最大离心力 12 000 *g* 以上)。

8.2.3 微量可调移液器(2.5 μ L、10 μ L、100 μ L、200 μ L、1000 μ L 等不同规格)。

8.2.4 无核酸酶离心管与吸头。

8.2.5 PCR 扩增管。

8.3 引物和探针

引物和探针针对 ASFV B646L 基因的保守序列设计。上游引物 VP72-F1:5'-GCTTTCAGGAT-AGAGATACAGCTCT-3'; 下游引物 VP72-R1: 5'-CCGTAGTGGAAGGGTATGTAAGAG-3'; TaqMan 探针 VP72-T1:FAM-CCGTAACTGCTCATGGTATCAATCTTATCG-BHQ1。

8.4 试验程序

8.4.1 核酸提取

方法同 7.4.1。

8.4.2 核酸扩增

8.4.2.1 扩增体系

每个样品配制 18 μ L 荧光 PCR 反应混合液,组成如下:

无核酸酶水	5.9 μ L
荧光 PCR 预混液(2×)	10 μ L
VP72-F1(10 μ mol/L)	0.8 μ L
VP72-R1(10 μ mol/L)	0.8 μ L
VP72-T1(10 μ mol/L)	0.5 μ L

将 18 μ L 荧光 PCR 反应混合液加入 PCR 扩增管;将 2 μ L DNA 模板加入每个 PCR 扩增管中。每次进行荧光 PCR 扩增时均应设阳性、阴性及空白对照。阳性对照应用阳性对照样品所提取核酸作为模板,阴性对照应用阴性对照样品所提取核酸作为模板,空白对照应用无核酸酶水作为模板。加入模板后,密封 PCR 扩增管,瞬时离心。将所有 PCR 扩增管放入荧光 PCR 仪中。按 8.4.2.2 运行扩增程序。

8.4.2.2 扩增条件

50 ℃孵育 2 min;95 ℃预变性 5 min;95 ℃变性 15 s,58 ℃退火延伸 1 min,45 个循环,在每一循环的 58 ℃时收集 FAM 荧光信号。

8.5 试验成立条件

阳性对照的 Ct 值 ≤ 30 且出现特异性扩增曲线,阴性对照无 Ct 值或阴性对照 Ct 值 ≥ 40 且无特异性扩增曲线,试验结果有效;否则应重新进行试验。

8.6 荧光 PCR 结果判定

符合 8.5 的条件,被检样品 Ct 值 ≤ 38 且出现特异性扩增曲线,则判为 ASFV 核酸阳性;当无 Ct 值或 Ct 值 ≥ 40 ,则判为 ASFV 核酸阴性;当 $38 < \text{Ct 值} < 40$ 且出现特异性扩增曲线,则判为疑似。对疑似样品,模板量加倍(4 μL DNA 模板)进行 1 次复检,做 3 个重复;有 2 个重复 Ct 值 ≤ 40 且出现特异性扩增曲线即判为 ASFV 核酸阳性,否则判为 ASFV 核酸阴性。

9 荧光 RAA 方法

9.1 试剂

9.1.1 DNA 提取试剂盒。

9.1.2 无核酸酶水,配制方法见 B.1。

9.1.3 RAA 反应预混液。

9.1.4 RAA 荧光基础反应单元:包含重组酶,单链结合蛋白,DNA 聚合酶的冻干粉。

9.1.5 280 mmol/L 乙酸镁。

9.2 仪器设备

9.2.1 恒温荧光基因检测仪。

9.2.2 台式低温高速离心机(最大离心力 12 000 g 以上)。

9.2.3 微量可调移液器(2.5 μL 、10 μL 、100 μL 、200 μL 、1 000 μL 等不同规格)。

9.2.4 无核酸酶离心管与吸头。

9.3 引物

引物和探针针对 ASFV B646L 基因的保守序列设计。上游引物 VP72-F2:5'-TAGTGATAGAC-CCCACGTAATCCGTGTCCCAAC-3';下游引物 VP72-R2:5'-CGATGATCCGGGTGCGATGAT-GATTACCTT-3';探针 VP72-T2:GATACGTAAATATGACCACTGGGTTGGTAT (FAM-dT) C (THF)(BHQ1-dT)CCCGTGGCTTCAAAG。

9.4 试验程序

9.4.1 核酸提取

方法同 7.4.1。

9.4.2 核酸扩增

9.4.2.1 扩增体系

每个样品配制 42.5 μL 荧光 RAA 反应混合液,组成如下:

RAA 预混液	37.7 μL
VP72-F2(10 $\mu\text{mol/L}$)	2.1 μL
VP72-R2(10 $\mu\text{mol/L}$)	2.1 μL
VP72-T2(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.6 μL

将 42.5 μL 荧光 RAA 反应混合液加入 RAA 荧光基础反应单元中;将 5 μL DNA 模板加入每个反应管中,将 2.5 μL 乙酸镁加在反应单元管盖上。每次进行荧光 RAA 扩增时均应设立阳性、阴性及空白对照。阳性对照应用阳性对照样品所提取核酸作为模板,阴性对照应用阴性对照样品所提取核酸作为模板,空白对照应用无核酸酶水作为模板。加入模板后,密封反应管,放入恒温振荡混匀仪。完成混匀收集后,将所有反应管放入荧光恒温检测仪中。按 9.4.2.2 运行扩增程序。

9.4.2.2 扩增条件

扩增温度 39 $^{\circ}\text{C}$,扩增时间 15 min,每隔 20 s 收集荧光信号。

9.5 试验成立条件

阳性对照起峰时间 ≤ 1.67 min 且出现特异性起峰曲线,阴性对照无起峰时间或阴性对照起峰时间 > 10 min且无特异性起峰曲线,试验结果有效;否则应重新进行试验。

9.6 荧光 RAA 结果判定

符合 9.5 的条件,被检样品起峰时间 ≤ 10 min 且出现特异性起峰曲线,则判为 ASFV 核酸阳性;被检样品无起峰时间或被检样品起峰时间 > 10 min 且无特异性起峰曲线,则判定为 ASFV 核酸阴性。

10 高敏荧光免疫分析法

10.1 试剂

10.1.1 无核酸酶水,配制方法见 B.1。

10.1.2 0.1 mol/L PBS(pH 7.4),配制方法见 A.1。

10.1.3 ASFV 抗原高敏荧光检测试剂卡(检测卡)。

10.2 仪器设备

10.2.1 高敏荧光分析仪。

10.2.2 组织匀浆机。

10.2.3 微量可调移液器(2.5 μL 、10 μL 、100 μL 、200 μL 、1 000 μL 等不同规格)。

10.2.4 台式低温高速离心机(最大离心力 12 000 g 以上)。

10.3 试验程序

10.3.1 样本前处理

10.3.1.1 血液样本处理

全血需经过抗凝处理,血清、血浆无需处理。

10.3.1.2 组织样本处理

取猪组织(优先采集脾或淋巴结组织)4 g加入匀浆机,加入1 mL 0.1 mol/L PBS(pH 7.4)缓冲液,打碎搅拌成匀浆、离心,取上清液待检。

10.3.2 准备

待检样本和检测卡从2℃~8℃取出,平衡到室温(25℃左右);高敏荧光分析仪开机。

10.3.3 加样

10.3.3.1 血清、血浆或组织提取上清液

用微量可调移液器吸取样本40 μL加入检测卡,然后加入50 μL稀释液,从加样开始静置免疫反应15 min后读值。

10.3.3.2 全血、黏稠样品

用微量可调移液器吸取样本50 μL加入检测卡,5 min后加入50 μL稀释液,接着再加入50 μL稀释液冲洗。从加样开始静置免疫反应15 min后读值。

10.3.3.3 唾液、粪便、污水样品

用微量可调移液器吸取样本40 μL加入检测卡,然后加入50 μL稀释液,从加样开始静置免疫反应15 min后读值。

10.3.4 检测

避光层析15 min后,将检测卡放入高敏荧光分析仪,点击“诊断”读值。

10.4 高敏荧光免疫分析结果判定

读值与ASFV抗原含量成正比。

10.4.1 检测结果判定

被检样品读值<12,则判定为ASFV抗原阴性;被检样品读值≥16,则判定为ASFV抗原阳性;12<被检样品读值<16,则判定为可疑。

10.4.2 可疑样品复测判定

可疑样品读值<12,则判定为ASFV抗原阴性;可疑样品读值≥12,则判定为ASFV抗原阳性。

11 夹心 ELISA 抗原检测方法

11.1 试剂

11.1.1 包被抗体:ASFV P30 蛋白单克隆抗体。

11.1.2 酶标抗体:辣根过氧化物酶标记的 P30 蛋白单抗(针对 P30 蛋白的不同表位)。

11.1.3 对照:ASFV 阳性对照(纯化的杆状病毒表达 P30 蛋白)、ASFV 阴性对照(SPF 猪血清)。

11.1.4 包被缓冲液,配制方法见附录 C 的 C.1。

11.1.5 封闭缓冲液,配制方法见 C.2。

11.1.6 稀释缓冲液,配制方法见 C.3。

11.1.7 洗涤缓冲液,配制方法见 C.4。

11.1.8 TMD 底物溶液,配制方法见 C.5。

11.1.9 终止液,配制方法见 C.6。

11.2 仪器设备

11.2.1 酶标仪。

11.2.2 恒温孵育箱。

11.2.3 洗板机或洗涤瓶。

11.2.4 96 孔酶标板。

11.2.5 “U”型 96 孔稀释板。

11.2.6 微量可调移液器(2.5 μ L、10 μ L、100 μ L、200 μ L、1000 μ L 等不同规格)。

11.2.7 贮液槽。

11.2.8 封板膜。

11.2.9 吸水纸巾。

11.3 试验程序

11.3.1 包被酶标板

P30 蛋白单克隆抗体用包被缓冲液 1:200 倍稀释后,每孔 100 μ L 包被 96 孔酶标板,37 $^{\circ}$ C 饱和湿度下吸附 2 h,用洗涤缓冲液洗板 4 次后拍干,300 μ L/孔加入封闭缓冲液,37 $^{\circ}$ C 饱和湿度下吸附 2 h,用洗涤缓冲液洗板 4 次后拍干。

11.3.2 夹心 ELISA 抗原检测操作步骤

11.3.2.1 在所有孔中加入稀释液,25 μ L/孔。

11.3.2.2 酶标板上对照和待检样品的分布图,见图 1。在 A1、B1 孔中加入阳性对照,25 μ L/孔;在 C1、D1 孔中加入阴性对照,25 μ L/孔;在 E1、F1 等其余孔加入待检样品,25 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min。

11.3.2.3 弃去反应孔中的液体,每孔用洗涤缓冲液清洗 4 次,洗涤缓冲液 300 μ L/孔。

11.3.2.4 每孔加入酶标抗体(1 \times),50 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。

11.3.2.5 弃去反应孔中的液体,每孔用洗涤缓冲液清洗 4 次,洗涤缓冲液 300 μ L/孔。

11.3.2.6 每孔加入底物溶液,50 μ L/孔,室温避光作用 10 min。

11.3.2.7 每孔中加入 50 μ L 终止液,终止反应。

11.3.2.8 用酶标仪在 450 nm 波长下测定各孔 OD 值。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P	S5										
B	P	S6										
C	N	S7										
D	N	S8										
E	S1	S9										
F	S2	S10										
G	S3	S11										
H	S4	S12										

说明：

P——阳性对照孔；

N——阴性对照孔；

S1、S2、S3、S4 等——待检样品孔，其余类推。

图 1 样品加样记录表(推荐模式)

11.4 试验成立条件

阳性对照 OD_{450} 值 >0.5 ，且阴性对照 OD_{450} 值 <0.09 ，试验结果有效；否则，应重新进行试验。

11.5 夹心 ELISA 抗原检测结果判定

在试验成立的前提下，待检样品 $OD_{450} > 0.12$ ，则判定该待检样品为 ASFV 抗原阳性； $OD_{450} \leq 0.12$ ，则判定该待检样品为 ASFV 抗原阴性。

12 间接 ELISA 抗体检测方法

12.1 试剂

12.1.1 包被抗原：杆状病毒表达的 ASFV P30 重组蛋白。

12.1.2 酶标抗体：辣根过氧化物酶标记的羊抗猪二抗。

12.1.3 对照：ASFV 阳性对照血清、ASFV 阴性对照血清。

12.1.4 包被缓冲液，配制方法见 C.1。

12.1.5 封闭缓冲液，配制方法见 C.2。

12.1.6 稀释缓冲液，配制方法见 C.3。

12.1.7 洗涤缓冲液，配制方法见 C.4。

12.1.8 TMD 底物溶液，配制方法见 C.5。

12.1.9 终止液，配制方法见 C.6。

12.2 仪器设备

见 11.2。

12.3 试验程序

12.3.1 包被酶标板

用包被缓冲液将 ASFV P30 重组蛋白稀释至终浓度 $0.3 \mu\text{g/mL}$ ，每孔 $100 \mu\text{L}$ 包被 96 孔酶标板奇

数条作为检测孔,使用抗原稀释液包被 96 孔酶标板偶数条作为对照孔,37 ℃饱和湿度下吸附 2 h,用洗涤缓冲液洗板 4 次后拍干,300 μL/孔加入封闭缓冲液,37 ℃饱和湿度下吸附 2 h,用洗涤缓冲液洗板 4 次后拍干。

12.3.2 间接 ELISA 抗体检测操作步骤

- 12.3.2.1 待检血清与阴性、阳性对照血清使用样品稀释液做 40 倍稀释。
- 12.3.2.2 酶标板上对照和待检样品的分布图,见图 2。50 μL/孔,在 A1、A2 和 B1、B2 孔中加入稀释后的阳性对照血清,在 C1、C2 和 D1、D2 孔中加入稀释后的阴性对照血清,在 E1、E2 等其余孔加入稀释后的待检血清,37 ℃孵育 60 min。
- 12.3.2.3 弃去反应孔中的液体,每孔用洗涤缓冲液清洗 4 次,洗涤缓冲液 300 μL/孔。
- 12.3.2.4 每孔加入酶标抗体(1×),50 μL/孔,37 ℃孵育 30 min。
- 12.3.2.5 弃去反应孔中的液体,每孔用洗涤缓冲液清洗 4 次,洗涤缓冲液 300 μL/孔。
- 12.3.2.6 每孔加入底物溶液,50 μL/孔,室温避光作用 10 min。
- 12.3.2.7 每孔中加入 50 μL 终止液,终止反应。
- 12.3.2.8 用酶标仪在 450 nm 波长下测定各孔 OD 值,按式(1)计算 OD₄₅₀ 差值。

$$OD_{450-C} = OD_{450-J} - OD_{450-O} \dots\dots\dots (1)$$

式中:
OD_{450-C}——OD₄₅₀ 差值;
OD_{450-J}——OD₄₅₀ 奇数孔值;
OD_{450-O}——OD₄₅₀ 偶数孔值。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P	P	S5	S5								
B	P	P	S6	S6								
C	N	N	S7	S7								
D	N	N	S8	S8								
E	S1	S1	S9	S9								
F	S2	S2	S10	S10								
G	S3	S3	S11	S11								
H	S4	S4	S12	S12								

说明:
P——阳性血清对照孔;
N——阴性血清对照孔;
S1、S2、S3、S4 等——待检血清孔,其余类推。

图 2 样品加样记录表(推荐模式)

12.4 试验成立条件

阳性对照 OD₄₅₀ 差>0.5,且阴性对照 OD₄₅₀ 差<0.2,试验结果有效;否则,应重新进行试验。

12.5 间接 ELISA 抗体检测结果判定

在试验成立的前提下,待检样品 OD₄₅₀ 差>0.2,则判定该待检样品为 ASFV 抗体阳性;待检样品

OD₄₅₀差≤0.2,则判定该待检样品为 ASFV 抗体阴性。

13 阻断 ELISA 抗体检测方法

13.1 试剂

- 13.1.1 包被抗原:杆状病毒表达的 ASFV P30 重组蛋白。
- 13.1.2 酶标抗体:辣根过氧化物酶标记的抗 ASFV P30 蛋白单抗。
- 13.1.3 对照:ASFV 阳性对照血清、ASFV 阴性对照血清。
- 13.1.4 包被缓冲液,配制方法见 C.1。
- 13.1.5 封闭缓冲液,配制方法见 C.2。
- 13.1.6 稀释缓冲液,配制方法见 C.3。
- 13.1.7 洗涤缓冲液,配制方法见 C.4。
- 13.1.8 TMD 底物溶液,配制方法见 C.5。
- 13.1.9 终止液,配制方法见 C.6。

13.2 仪器设备

见 11.2。

13.3 试验程序

13.3.1 包被酶标板



用包被缓冲液将 ASFV P30 重组蛋白稀释成终浓度为 0.3 μg/mL,每孔 100 μL 包被 96 孔酶标板,37 °C 饱和湿度下吸附 2 h,用洗涤缓冲液洗板 4 次,300 μL/孔加入封闭缓冲液,37 °C 饱和湿度下吸附 2 h,用洗涤缓冲液洗板 4 次后拍干。

13.3.2 阻断 ELISA 抗体检测操作步骤

- 13.3.2.1 酶标板上对照和样品的分布图,见图 3。每孔加入 50 μL 的稀释液,在 A1、B1 孔加入 50 μL 阳性对照血清,在 C1、D1 孔加入 50 μL 阴性对照血清,在 E1、F1 孔加入 50 μL 稀释液,其余每孔加入 50 μL 的血清样品,37 °C 孵育 60 min。
- 13.3.2.2 弃去反应孔中的液体,每孔用洗涤缓冲液清洗 5 次,洗涤缓冲液 300 μL/孔。
- 13.3.2.3 用稀释缓冲液将酶标 P30 单抗稀释至工作浓度,100 μL/孔,37 °C 孵育 30 min。
- 13.3.2.4 弃去反应孔中的液体,每孔用洗涤缓冲液清洗 5 次,洗涤缓冲液 300 μL/孔。
- 13.3.2.5 每孔加入底物溶液,100 μL/孔,室温避光作用 15 min。
- 13.3.2.6 每孔中加入 100 μL 终止液,终止反应。
- 13.3.2.7 用酶标仪在 450 nm 的波长下测定各孔 OD 值,计算阻断率。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P	S3										
B	P	S4										
C	N	S5										
D	N	S6										
E	Cm	S7										
F	Cm	S8										
G	S1	S9										
H	S2	S10										

说明：
P——阳性血清对照孔；
N——阴性血清对照孔；
Cm——酶标单抗对照孔；
S1、S2、S3、S4 等——待检血清孔，其余类推。

图 3 样品加样记录表(推荐模式)

13.4 阻断率计算方法

阻断率按式(2)~式(4)计算：

$$BR_S = 100 - (OD_{450-S} \times 100) \div OD_{450-Cm} \dots\dots\dots (2)$$
$$BR_{NC} = 100 - (OD_{450-NC} \times 100) \div OD_{450-Cm} \dots\dots\dots (3)$$
$$BR_{PC} = 100 - (OD_{450-PC} \times 100) \div OD_{450-Cm} \dots\dots\dots (4)$$

式中：
BR_S ——待检血清样品阻断率；
BR_{NC} ——阴性对照血清阻断率；
BR_{PC} ——阳性对照血清阻断率；
OD_{450-S} ——待检血清样品 OD₄₅₀ 值；
OD_{450-NC} ——阴性对照血清 OD₄₅₀ 值；
OD_{450-PC} ——阳性对照血清 OD₄₅₀ 值；
OD_{450-Cm} ——酶标单抗对照 OD₄₅₀ 值。

13.5 试验成立条件

阳性对照阻断率>70,且阴性对照阻断率<30,试验结果有效;否则,应重新进行试验。

13.6 阻断 ELISA 抗体检测结果判定

在试验成立的前提下,待检样品阻断率>50,则判定为 ASFV 抗体阳性;待检样品阻断率≤50,则判定为 ASFV 抗体阴性。

14 夹心 ELISA 抗体检测方法

14.1 试剂

14.1.1 包被抗原:ASFV 重组 P54 蛋白。

- 14.1.2 酶标抗原:辣根过氧化物酶标记的重组 P54 蛋白。
- 14.1.3 对照:ASFV 阳性对照血清、ASFV 阴性对照血清。
- 14.1.4 包被缓冲液,配制方法见 C.1。
- 14.1.5 封闭缓冲液,配制方法见 C.2。
- 14.1.6 稀释缓冲液,配制方法见 C.3。
- 14.1.7 洗涤缓冲液,配制方法见 C.4。
- 14.1.8 TMD 底物溶液,配制方法见 C.5。
- 14.1.9 终止液,配制方法见 C.6。

14.2 仪器设备

见 11.2。

14.3 试验程序

14.3.1 包被酶标板

ASFV 重组 P54 蛋白用包被缓冲液稀释至终浓度为 $0.1\ \mu\text{g}/\text{mL}$,按每孔 $100\ \mu\text{L}$ 的量包被 96 孔酶标板, $37\ ^\circ\text{C}$ 饱和湿度下吸附 2 h,用洗涤缓冲液洗板 4 次后拍干, $300\ \mu\text{L}/\text{孔}$ 加入封闭缓冲液, $37\ ^\circ\text{C}$ 饱和湿度下吸附 2 h,用洗涤缓冲液洗板 4 次后拍干。

14.3.2 ELISA 操作步骤

- 14.3.2.1 酶标板上对照和样品的分布图,见图 4。在 A1 和 B1 孔加入 ASFV 阳性对照血清各 $50\ \mu\text{L}$,在 C1 和 D1 孔加入 ASFV 阴性对照血清各 $50\ \mu\text{L}$;剩余孔中加入待检样品血清 $50\ \mu\text{L}$ 。
- 14.3.2.2 轻轻振匀孔中样品(勿溢出), $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育 20 min。
- 14.3.2.3 甩干 ASFV 抗原包被板孔中的液体,每孔加入 $300\ \mu\text{L}$ 洗涤缓冲液,洗涤 5 次,在洗涤和加入下一个试剂前,避免孔壁变干。
- 14.3.2.4 每孔加入 $50\ \mu\text{L}$ 的酶标抗原($1\times$); $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育 20 min。
- 14.3.2.5 甩干 ASFV 抗原包被板孔中的液体,每孔加入 $300\ \mu\text{L}$ 洗涤缓冲液,洗涤 5 次,在洗涤和加入下一个试剂前,避免孔壁变干。
- 14.3.2.6 每孔加入 $50\ \mu\text{L}$ 底物溶液 A 和 $50\ \mu\text{L}$ 底物溶液 B; $37\ ^\circ\text{C}$ 避光孵育 10 min。
- 14.3.2.7 每孔加入 $50\ \mu\text{L}$ 终止液终止显色反应;使用酶标仪测定 $450\ \text{nm}$ 波长处的 OD 值。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P	S5										
B	P	S6										
C	N	S7										
D	N	S8										
E	S1	S9										
F	S2	S10										
G	S3	S11										
H	S4	S12										

说明：
P——阳性血清对照孔；
N——阴性血清对照孔；
S1、S2、S3、S4 等——待检血清孔，其余类推。

图 4 样品加样记录表(推荐模式)



14.4 试验成立条件

OD_{450-NC} 值≤0.15 且 OD_{450-PC} 值≥0.6, 试验结果有效; 否则重新进行试验。
注: 阴性血清的平均 OD 值即为 OD_{450-NC}; 阳性血清的平均 OD 值即为 OD_{450-PC}。

14.5 夹心 ELISA 抗体检测结果判定

Cut Off 值按式(5)计算:
$$\text{Cut Off} = \text{OD}_{450-S} - \text{OC}_{450-NC} \dots\dots\dots (5)$$

式中:
OD_{450-S} ——待检血清样品 OD₄₅₀ 值;
OD_{450-NC} ——阴性对照血清 OD₄₅₀ 值。

在试验成立的前提下, Cut Off 值≤0.15, 则判为 ASFV 抗体阴性; Cut Off 值>0.15, 则判为 ASFV 抗体阳性。

15 间接免疫荧光方法

15.1 试剂

- 15.1.1 制备抗原板: 感染 ASFV 的细胞或者感染重组病毒(表达 ASFV 蛋白)的细胞固定于固相载体。
- 15.1.2 对照血清: ASFV 阳性对照血清、ASFV 阴性对照血清。
- 15.1.3 荧光二抗: 羊抗猪 IgG H&L(FITC)。
- 15.1.4 细胞固定液: 丙酮、甲醇按 1 : 1 比例配置。
- 15.1.5 封闭缓冲液, 配制方法见 C.2。
- 15.1.6 稀释缓冲液, 配制方法见 C.3。
- 15.1.7 洗涤缓冲液, 配制方法见 C.4。

15.2 仪器设备

- 15.2.1 荧光显微镜。
- 15.2.2 24 孔细胞培养板。
- 15.2.3 旋转振荡器。
- 15.2.4 恒温培养箱。
- 15.2.5 微量可调移液器(2.5 μ L、10 μ L、100 μ L、200 μ L、1000 μ L 等不同规格)。
- 15.2.6 与移液器匹配的吸头。
- 15.2.7 吸水纸巾。


15.3 试验程序

15.3.1 抗原板的制备

选择合适细胞铺制 24 孔细胞培养板,待细胞生长至 80%时,进行细胞计数。按合适的病毒量接种 ASFV 种毒或表达 ASFV 蛋白的重组病毒,37 $^{\circ}$ C 维持培养约 48 h。每孔加入 200 μ L 预冷细胞固定液将细胞固定 10 min,弃去固定液,将细胞培养板晾干。晾干后储存于-20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

15.3.2 间接免疫荧光检测操作步骤

- 15.3.2.1 将固定的抗原板从-20 $^{\circ}$ C 冰箱中取出,每孔用洗涤缓冲液清洗 3 次,洗涤缓冲液 1 000 μ L/孔。
- 15.3.2.2 抗原板上对照和样品的分布图,见图 5。弃去反应孔中的液体,在 A1 孔加入 200 μ L 阳性对照血清,在 B1 孔加入 200 μ L 阴性对照血清,其余每孔加入 200 μ L 的待检血清样品,37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min。

	1	2	3	4	5	6
A	P	S3				
B	N	S4				
C	S1					
D	S2					

说明:

- P——阳性血清对照孔;
- N——阴性血清对照孔;
- S1、S2、S3、S4 等——待检血清孔,其余类推。

图 5 样品加样记录表(推荐模式)

- 15.3.2.3 弃去反应孔中的液体,每孔用洗涤缓冲液清洗 3 次,洗涤缓冲液 1 000 μ L/孔。
- 15.3.2.4 用稀释缓冲液将荧光二抗稀释至工作浓度,200 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 50 min。
- 15.3.2.5 弃去反应孔中的液体,每孔用洗涤缓冲液清洗 3 次,洗涤缓冲液 1 000 μ L/孔。
- 15.3.2.6 荧光显微镜观察结果。

15.4 试验成立条件

阳性对照出现特异性绿色荧光,且阴性对照无特异性绿色荧光,试验结果有效;否则,应重新进行试验。

15.5 间接免疫荧光结果判定

在试验成立的前提下,待检样品出现特异性绿色荧光,则判定待检样品为 ASFV 抗体阳性。待检样品无特异性绿色荧光,则判定待检样品为 ASFV 抗体阴性。待检样品出现非特异性绿色荧光或荧光信号较弱,则判定待检样品为 ASFV 抗体可疑,建议重新检测血清样品或用不同的方法重新检测。

16 综合判定

16.1 经 5.4 判定为疑似 ASF 病例,经普通 PCR 方法(见第 7 章)、荧光 PCR 方法(见第 8 章)、荧光 RAA 方法(见第 9 章)任一项检测出 ASFV 核酸阳性的,或经高敏荧光免疫分析法(见第 10 章)、夹心 ELISA 抗原检测方法(见第 11 章)任一项检测出 ASFV 抗原阳性的,可诊断为 ASF 病例。如经普通 PCR 方法(见第 7 章)检测出 ASFV 核酸阴性的,或经高敏荧光免疫分析法(见第 10 章)、夹心 ELISA 抗原检测方法(见第 11 章)检测出 ASFV 抗原阴性的,仍需经荧光 PCR 方法(见第 8 章)、荧光 RAA 方法(见第 9 章)进行再检,任一项检出 ASFV 核酸阳性的,可诊断为 ASF 病例。

16.2 无明显临床症状的易感动物,经普通 PCR 方法(见第 7 章)、荧光 PCR 方法(见第 8 章)、荧光 RAA 方法(见第 9 章)任一项检测出 ASFV 核酸阳性的,或经高敏荧光免疫分析法(见第 10 章)、夹心 ELISA 抗原检测方法(见第 11 章)任一项检测出 ASFV 抗原阳性的,可诊断为 ASFV 感染;如经普通 PCR 方法(见第 7 章)检测出 ASFV 核酸阴性的,或经高敏荧光免疫分析法(见第 10 章)、夹心 ELISA 抗原检测方法(见第 11 章)检测出 ASFV 抗原阴性的,仍需经荧光 PCR 方法(见第 8 章)、荧光 RAA 方法(见第 9 章)进行再检,任一项检出 ASFV 核酸阳性的,可诊断为 ASF 感染。

16.3 经间接 ELISA 抗体检测方法(见第 12 章)、阻断 ELISA 抗体检测方法(见第 13 章)、夹心 ELISA 抗体检测方法(见第 14 章)、间接免疫荧光方法(见第 15 章)任一项检测出 ASFV 抗体阳性的,可诊断为 ASFV 抗体阳性;如经间接 ELISA 抗体检测方法(见第 12 章)、阻断 ELISA 抗体检测方法(见第 13 章)、夹心 ELISA 抗体检测方法(见第 14 章)检测结果不一致的,需经间接免疫荧光方法(见第 15 章)进行确诊。

附 录 A
(规范性附录)
样品保存液的配制方法

A.1 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4)

氯化钠(NaCl)	85.00 g
磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	15.49 g
磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)	2.03 g
加去离子水至	1 000 mL

或者

氯化钠(NaCl)	80.0 g
氯化钾(KCl)	2.0 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	30.0 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	2.0 g
加去离子水至	1 000 mL

A.2 0.04 mol/L PBS (pH 7.4)

0.1 mol/L PBS	400 mL
去离子水	600 mL
103 kPa 高压蒸汽灭菌 30 min, 室温或 4 °C 冰箱保存。	

A.3 50%甘油-PBS 保存液

0.04 mol/L PBS 与纯甘油等量混合, 调整 pH 值至 7.4, 分装成小瓶。103 kPa 高压蒸汽灭菌 30 min。室温或 4 °C 冰箱保存。

附 录 B

(规范性附录)

聚合酶链式反应溶液的配制方法

B.1 无核酸酶水

DEPC	1 mL
去离子水	1 000 mL

充分混匀,将瓶盖拧松后置于 37 °C 放置过夜,高压灭菌。

B.2 50×TAE 贮存液

三羟甲基氨基甲烷(Tris)	242.0 g
冰乙酸	57.1 mL
0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)	100.0 mL

加蒸馏水至 1 000 mL。

B.3 1×TAE 缓冲液

使用前将 50×TAE 作 50 倍稀释即可。

B.4 2%的琼脂糖凝胶

琼脂糖	1 g
1×TAE 缓冲液	50 mL
Gold View 溶液(10 mg/mL)	2.5 μL

称取 1 g 琼脂糖,置于 200 mL 锥形瓶中,加入 50 mL 1×TAE 缓冲液,加热溶解,冷却至 50 °C ~ 60 °C 时加入 2.5 μL Gold View 溶液,倒入胶槽内自然凝固。



附 录 C

(规范性附录)

酶联免疫吸附试验溶液的配制方法

C.1 包被缓冲液——0.05 mol/L pH 9.6 碳酸盐缓冲液

Na ₂ CO ₃	0.318 g
NaHCO ₃	0.588 g
去离子水	200 mL

用 0.22 μm 膜过滤除菌,室温保存备用。

C.2 封闭缓冲液(含 2%BSA 的 pH 7.4 PBS)

pH7.4 PBS	1 000 mL
BSA	20 g

现配现用。

C.3 稀释缓冲液(含 1%BSA 的 pH 7.4 PBS)

pH7.4 PBS	1 000 mL
BSA	10 g

现配现用。

C.4 洗涤缓冲液——pH 7.4 PBST (0.05%吐温-20)

pH7.4 PBS	1 000 mL
吐温-20	0.5 mL

现配现用。

C.5 TMD 底物溶液

底物溶液 A:

TMB	200 mg
无水乙醇	100 mL

蒸馏水加至 1 000 mL。

底物溶液 B:

磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄ ,分析纯)	71.7 g
柠檬酸(C ₆ H ₈ O ₇ ,分析纯)	9.33 g
0.75%过氧化氢尿素	6.4 mL

加蒸馏水至 1 000 mL,调整 pH 值至 5.0~5.4。

将底物溶液 A 和底物溶液 B 按 1:1 混合,现配现用。

C.6 终止液(2 mol/L 硫酸)

111 mL 分析纯浓硫酸缓慢逐滴加入 889 mL 去离子水中,室温分装保存。
