



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Veterinaria
Departamento de Sanidad Animal



ОБНАРУЖЕНИЕ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ МЕТОДОМ ИММУНОБЛОТТИНГА (ИБ)

jmvizcaino@vet.ucm.es
Av/ Puerta de Hierro s/n.
28040 Madrid.

Tel: (34) 913944082
Fax: (34) 913943908



1. Материалы

- Одноканальные пипетки переменного объема 1-10 μ l
- Одноканальные пипетки переменного объема 10-100 μ l
- Одноканальные пипетки переменного объема 10-200 μ l
- Одноканальные пипетки переменного объема 200
- Инкубатор на 37°C
- Аналитические весы
- Дистиллированная вода
- Планшет для инкубации (ref:170-3902.BIORAD)
- Ph-метр
- Шейкер или вортек
- Полистироловая пробирка объемом 50 мл (ref: 4870.COSTAR)
- Стерильные пластиковые пробирки (10 мл,50 мл)
- Настольная центрифуга.
- Резиновые перчатки.
-

2. РЕАКТИВЫ:

- **Блокирующий раствор: 2% (в/о) молоко в ФСБ/Твин-20 pH 7,2**

ФСБ буфер pH 7.2/ 0.05% Твин-20:

СlNa [Merck 1.06404]-----	8 г
СlК [Merck 1.04873]-----	0,2 г
PO ₄ H ₂ К [Merck 1.06586]-----	0,2 г
PO ₄ HNa ₂ [Merck 1.04936]-----	1,15г
Твин-20 [Merck 8.22184]-----	0,5 мл
H ₂ O дистиллированная-----	1000 мл

Проверить pH(9,6) перед использованием.

ФСБ/ Твин 20 с 2% молока:

Сухое обезжиренное молоко (NESTLÉ-Sveltesse o Molico)- 2г
ФСБ буфер pH 7.2 – Твин-20 0.05%-----1000 мл



Хранит при 4°C. Не использовать после двух дней хранения.

➤ **Конъюгат:**

Протеин А пероксидаза 1 мг/мл (PIERCE, ref.0032400) хранить при 4°C. Ресуспендировать в 200 µl дистиллированной воды и хранить при -20°C. Перед использованием его со стрипами для ИБ, разведите 1/1000 в ФСБ1х/0,05% Твин-20 с 2% молока буфере.

➤ **Раствор субстрата:**

- a) Растворите 6мг 4-chloronaphtol (хлорнафтол) в 2 мл метанола.
- b) Медленно добавьте 4-хлорнафтол/Метанол к 10мл ФСБ буфера pH 7.2 интенсивно помешивая.
- c) Затем, добавьте 4 µl перекиси водорода H₂O₂ 30% (Panreac) к ФСБ - хлорнафтол/Метанол раствору.

3. МЕТОДОЛОГИЯ

- 3.1) Посчитайте необходимое количество нитроцеллюлозных фильтров.
- 3.2) Посчитайте необходимое количество ванночек для стрипов
- 3.3. Поместите стрипы в ванночку
- 3.4) Добавьте к нитроцеллюлозному стрипу блокирующий раствор(1 мл/стрип) (ФСБ буфер pH 7.2-Твин 20 0,05% с 2% молока)
- 3.5 Инкубируйте 30 минут при 37°C при постоянном помешивании.
- 3.6) Промойте 4 раза ФСБ буфером pH 7.2-Твин 20 0,05% с 2% молока, 1мл на стрип.
- 3.7) Добавьте 1 мл исследуемой и контрольной сывороток в разведении 1/40 в блокирующем растворе in blocking solution (буфером pH 7.2-Твин 20 0,05% с 2% молока).
- 3.8) Инкубируйте 45 минут при 37°C при постоянном помешивании.



3.9) Промойте 4 раза ФСБ буфером рН 7.2-Твин 20 0,05% с 2% молока, 1мл на стрип.

3.10) приготовление и добавление конъюгата:

11µl Протеина А + 10.989 11µl ФСБ буфера рН 7.2-Твина-20 0,05%-2% молока (на одну ванночку)

3.11) Инкубируйте 45 минут при 37°C при постоянном помешивании.

3.12) Промойте 4 раза ФСБ буфером рН 7.2-Твин 20 0,05% с 2% молока, 1мл на стрип.

3.13) Приготовление субстрата:

6 мг 4-хлорнафтола + 2 мл Метанола + 10 мл ФСБ буфер + 4 µl Перекиси водорода H₂O₂

3.14) Добавьте 1 мл субстрата

3.15) Остановите реакцию после 10-15 минут добавлением дистиллированной воды.

4. УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сыворотка, показывающая характерный рисунок на стрипе, сходный со стрипом обработанной положительной сывороткой, считается положительной по наличию антител к вирусу АЧС.

Любая ИФА-положительная или сомнительная сыворотка, которая не дает четких результатов с белками АЧС при иммуноблоттинге считается отрицательной по наличию антител к вирусу АЧС.