

ICS 11.220

B 41

团 体 标 准

T/ CVMA X43—2019

猪瘟病毒抗体化学发光免疫分析检测方法

Chemiluminescent Immunoassay for Detection of Classical Swine
Fever Virus Antibody

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。

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、中国兽医药品监察所、洛阳现代生物技术研究有限公司、甘肃省动物疫病预防控制中心、西藏自治区动物疫病预防控制中心、云南省动物疫病预防控制中心、广西壮族自治区动物疫病预防控制中心、江西省动物疫病预防控制中心、四川省动物疫病预防控制中心、山东省动物疫病预防与控制中心、河北省动物疫病预防控制中心、黑龙江省动物疫病预防控制中心、重庆市动物疫病预防控制中心。

本标准主要起草人：孙雨、王传彬、王琴、李秀梅、宋晓晖、赵晓春、肖颖、蒋菲、杨林、徐璐、王睿男、赵启祖、张乾义、夏应菊、曹丽萍、央珍、康文彪、魏润生、曾邦权、邹联斌、韦正吉、甘平、阳爱国、陈冬、田夫林、王贵升、薛瑞雪、党安坤、李硕、曲萍、吕园园、任雪建、徐亚东、康新华、王文莉、顾贵波、贾俊元、徐峥嵘、郑红飞、豆玲、张登基、张莉、毋艳萍、杨晓帆、胡冬梅、邹兴启、马英、李晓霞、毕一鸣、朱元源、刘近、刘玉良、倪建强、韩焘、原霖、亢文华、顾小雪、杨志、杨天意、孙航、耿玉静、孙圣福。

猪瘟病毒抗体化学发光免疫分析检测方法

1 范围

本标准规定了猪瘟病毒化学发光抗体检测试剂盒检测猪瘟病毒抗体的检测方法。

本标准适用于化学发光法检测猪血清中的猪瘟病毒抗体，适用于评估养殖场猪瘟疫苗免疫状况，可用于动物疫病的调查。

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。

NY/T 541-2016兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范执行。

3 试剂与耗材

3.1 猪瘟病毒 E2 重组蛋白，见附录 A。

3.2 猪瘟病毒单克隆抗体，见附录 B。

3.3 酶结合物，见附录 B。

3.4 包被缓冲液，见附录 C.1。

3.5 PBS，见附录 C.2。

3.6 封闭液，见附录 C.3。

3.7 酶结合物稀释液，见附录 C.4。

3.8 校准品稀释液，见附录 C.5。

3.9 校准品 1~校准品 6，见附录 C.6~C.7。

3.10 25 倍浓缩洗涤液，见附录 C.8。

3.11 化学发光底物 A，见附录 C.9。

3.12 化学发光底物 B, 见附录 C.10。

4 器材与设备

4.1 化学发光免疫分析仪。

4.2 分析天平。

4.3 洗板机。

4.4 37℃温箱。

4.5 2℃~8℃冰箱, -20℃冰箱。

4.6 单道微量移液器 (0.5 μL~10 μL; 10 μL~100 μL; 20 μL~200 μL; 100 μL~1 000 μL)。

4.7 多道移液器 (300μL)。

4.8 NUNC 反应板。

4.9 血清稀释板: 96孔一次性U型血凝板或96孔细胞培养板。

4.10 一次性注射器 (5mL~10mL)。

5 实验前准备工作

5.1 样本采集及处理

采集静脉血时, 每只猪使用一个注射器。建议进行静脉无菌采血, 不少于2mL。室温静置于斜面2h, 待血液自然凝固后, 置2℃~8℃冰箱中放置不少于2h, 4000r/min离心10min。用移液器小心吸出上层血清。

5.2 血清样本的存放与运送

血清样本若在一周内检测, 可置2℃~8℃条件下保存。若超过一周检测, 应置于-20℃以下冷冻保存。运输时注意冷藏, 确保样品有效。采集的血清样本可用冰袋或保温桶加冰密封等方式运输, 运输时间应尽量缩短。按照《兽医实验室生物安全技术管理规范》进行样品的生物安全标识。

6 操作步骤

6.1 包被

将重组蛋白用包被缓冲液稀释至 $0.1 \mu\text{g/ml}$ ，加入发光板中， $100 \mu\text{l/孔}$ ，置 37°C 包被3小时。

6.2 洗板

弃去包被液，用洗涤液洗板2次，甩掉孔中液体，拍干。

6.3 封闭

每孔加入 $150 \mu\text{l}$ 封闭液，置于 37°C 封闭2h。

6.4 洗板

弃去封闭液，在吸水纸上拍干。

6.5 干燥

置于 37°C 干燥3h。装入铝箔袋，加干燥剂，抽真空，置于 $2^\circ\text{C}\sim 8^\circ\text{C}$ 保存备用。

6.6 加样

取出抗原包被板。每次实验需设置系列校准品6孔。首先在血清稀释板上依次加入校准品1~校准品6各 $60 \mu\text{l}$ ，其余各孔依次加入待检样品各 $60 \mu\text{l}$ ，再向以上各孔均加入 $60 \mu\text{l}$ 酶结合物，震荡混匀；每孔吸取 $100 \mu\text{l}$ 转移至抗原包被板对应孔内。

6.7 温育

置 37°C 恒温培养箱中温育30分钟（ ± 1 分钟）。

6.8 洗板

取出反应板，弃去反应液，每孔加入 $300 \mu\text{l}$ 洗涤液，室温放置片刻，弃去洗涤液，重复5次；或者使用自动洗板机洗板5次。

6.9 加入底物

每孔加入 $50 \mu\text{L}$ 的化学发光底物A和 $50 \mu\text{L}$ 的化学发光底物B，振荡混匀（也可化学发光底物A、B等比例混匀后加 $100 \mu\text{L}$ ）

6.10 静置

在15~25℃条件下避光静置5分钟。

6.11 读值

静置后15分钟内用化学发光仪读取发光值。

7 结果计算方法

以校准品1至校准品6的发光值为纵坐标，对应的抗体剂量值（0NCU/ml、10 NCU/ml、20 NCU/ml、40 NCU/ml、100 NCU/ml、200 NCU/ml）为横坐标，通过ELISACalc软件绘制校准品的四参数拟合曲线，四参数模式为 $Y=(a-b)/[1+(x/c)^b]+d$ 。将样本的发光值代入校准曲线计算，即可得出样品中猪瘟病毒抗体的含量。

8 试验成立条件

将6个校准品的发光值与对应抗体剂量值进行四参数拟合， $R^2 \geq 0.99$ ，试验成立。否则，应重新检测。

9 结果判定

如果待测样品中抗体含量 < 临界值20 NCU/ml，样品应判定为猪瘟病毒抗体阴性；如果样品的抗体剂量值 ≥ 20 NCU/ml，则该样品判定为猪瘟病毒抗体阳性。

附录 A

(规范性附录)

猪瘟病毒 E2 重组蛋白的制备

A.1 生产用毒种的繁殖

取生长良好的 Sf9 细胞，将毒种按照约 1:100 的比例感染贴壁细胞，约 72 小时后待 70%~80% 的细胞出现 CPE（增大或裂解）现象时，将细胞吹打下来，收集病毒液，即为生产用毒种。

A.2 包被抗原 E2 重组蛋白病毒液的制备

将 Sf9 细胞悬浮培养，初始接种密度应大于 5×10^5 个/ml，待细胞长至对数生长期时（细胞密度约 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 个/ml），按 1% 的比例接种生产用毒种，继续培养约 3 日后，观察细胞增大并将要裂解之前，离心收集培养上清。

A.3 包被抗原 E2 重组蛋白的纯化

将培养上清进行透析后，用阳离子交换柱纯化（SP Sepharose Fast Flow）进行梯度洗脱，收集含有目标蛋白的组分，0.1mol/L pH9.0 的 Tris-HCl 缓冲液调节 pH 值至 7.5，用 His-tag 柱亲和纯化（Ni Sepharose 6 Fast Flow），收集目标蛋白组分，并用 PB（20mmol/L PB，150mmol/L 氯化钠，pH 值 7.0）透析，置 -70°C 以下保存备用。

附录 B

(规范性附录)

猪瘟病毒 E2 蛋白单克隆抗体的制备

B.1 猪瘟病毒 E2 蛋白单克隆抗体的制备

B.1.1 杂交瘤细胞繁殖

1C8 株杂交瘤细胞复苏后,用含 15%胎牛血清的 DMEM 培养液制成细胞悬液,置 37℃、含 5%CO₂ 培养箱中培养 5 代。收集每代次的细胞上清,进行梯度稀释,用包被猪瘟病毒 E2 蛋白(浓度为 0.25μg/ml)的反应板进行检测,以 OD_{450nm} 值≥1.0 的最高稀释倍数作为抗体效价,应不低于 1:100。

B.1.2 猪瘟病毒 E2 蛋白单克隆抗体小鼠腹水的制备

选取经产 BalB/C 雌鼠,按 0.5ml/只腹腔注射无菌液体石蜡,7~10 日后每只小鼠腹腔接种 1×10⁶~5×10⁶ 个 1C8 株杂交瘤细胞,经 7~10 日后可见小鼠腹部明显膨大,采集腹水。采集的腹水以 8000r/min 离心 10 分钟,收集上清,弃沉淀,-70℃以下冻存备用。

B.1.3 猪瘟病毒 E2 蛋白单克隆抗体的纯化

B.1.3.1 1C8 腹水的脱脂

将收集的 1C8 腹水在 4℃条件下,以 10000r/min 离心 10 分钟,吸取上清。每毫升腹水中加入 10%硫酸葡聚糖钠盐溶液 40 μl 和 1mol/L 氯化钙溶液 1ml。室温混合 15 分钟。在 4℃条件下,以 10000r/min 离心 10 分钟,取上清。

B.1.3.2 脱盐

取 10g Sephadex G50 层析介质,置于 500ml 蒸馏水中充分浸泡,期间换液,弃去上层细粒。室温浸泡 24 小时。将层析介质灌注于层析柱中,在灌注过程中应确保填充介质均匀,不能出现断层和气泡。

用 PB 上样缓冲液(20mmol/L, pH 值 7.0)对层析柱进行平衡。平衡后,待液面恰好流入层析柱时,加入 1/10 柱体积的脱脂腹水。待腹水流入层析柱后,加入上样缓冲液进行淋洗。收集最大的蛋白峰(第 1 峰),即为脱盐腹水。然后继续淋洗层析柱,直至蛋白和盐离子全部流出后,层析柱再生,即可重复上样。

B.1.3.3 亲和层析

将亲和层析预装柱用上样缓冲液淋洗,直至预装柱中的原有液体全部流出。取 5ml 收集的脱盐腹水上样,上样结束后,继续用上样缓冲液进行淋洗,待未结合的蛋白全部流出,且流出液中检测不到蛋白后,换成洗脱液(0.1mol/L glycine-HCl, pH 值 2.7)进行淋洗,收集流出第一个蛋白峰。将收集液中

加入适当体积的 1mol/L Tris-HCl 缓冲液，调节 pH 值。

B. 1. 3. 4 透析

将纯化后的单抗装入透析袋内，置于 2~8℃ 冰箱中，用 10 倍体积的 0.01mol/L PBS (pH 值 7.2~7.4) 进行透析，期间换液 2~3 次。将透析后的蛋白保存于 -40℃ 条件下备用。

B. 2 单克隆抗体的 HRP 标记及纯化 (酶结合物的制备)

B. 2. 1 HRP 的标记

称取 2mg HRP 溶解于 0.5ml 蒸馏水中，加入 0.5ml 新配的 0.06mol/L NaIO₄ 溶液，在 4℃ 条件下避光 30 分钟。加入 160mmol/L 的乙二醇 0.5ml，室温放置 30 分钟后，加入纯化的单抗 2mg，混匀。将上述溶液装入透析袋中，置 2000ml 的 0.05mmol/L CB Buffer 中透析，在 4℃ 条件下搅拌过夜。透析液吸至 15ml 的离心管中，加 0.2ml 新配的 5mg/ml NaBH₄ 溶液，混匀，再置在 4℃ 条件下 12 小时。

B. 2. 2 游离 HRP 的去除

取 10g Sephadex G50 层析介质，置于 500ml 蒸馏水中充分浸泡，期间换液，弃去上层细粒。室温浸泡 24 小时。将层析介质灌注于层析柱中，在灌注过程中应确保填充介质均匀，不能出现断层和气泡。

用 PBS 上样缓冲液 (20mmol/L, pH 值 7.0) 对层析柱进行平衡。平衡后，待液面恰好流入层析柱时，加入 1/10 柱体积的标记单抗。待标记单抗流入层析柱后，加入上样缓冲液进行淋洗。收集最大的蛋白峰 (第 1 峰)，即为标记 HRP 的单克隆抗体。然后继续淋洗层析柱，直至游离的 HRP 的全部流出后，层析柱再生，即可重复上样。

B. 3 酶结合物的制备

将酶标单抗用酶结合物稀释液稀释至工作浓度，搅拌均匀，无菌定量分装，置 2~8℃ 保存。

附录 C

(规范性附录)

相关试剂的配制

C.1 包被缓冲液

称取碳酸钠 1.59g、碳酸氢钠 2.93g，加双蒸水 800ml，搅拌溶解，再加双蒸水定容至 1000ml，pH 值应为 9.4~9.6。

C.2 PBS

磷酸氢二钠 2.9g、磷酸二氢钾 0.2g、氯化钠 8g、氯化钾 0.2g，加入 1000ml 双蒸水搅拌溶解，pH 值应为 7.2~7.6。

C.3 封闭缓冲液

量取出 800ml 的 PBS，称取酪蛋白 10g、蔗糖 50g、500 μ l PROCLIN-300、0.5ml 吐温-20 加入其中，搅拌溶解，再加 PBS 定容至 1000ml。

C.4 酶结合物稀释液

取 PBS 800ml，加入牛血清白蛋白 10g，PROCLIN-300 500 μ l、吐温-20 1ml，而后加入 PBS 定容至 1000ml，再加入 0.1%的胭脂红色素，过滤除菌。

C.5 校准品稀释液

取 PBS 800ml，加入牛血清白蛋白 10g，PROCLIN-300 500 μ l、吐温-20 1ml，而后加入 PBS 定容至 1000ml，过滤除菌，2~8 $^{\circ}$ C 保存。

C.6 校准品 1

用校准品稀释液将标准阴性血清按 1:20 比例进行稀释，将抗体剂量值赋值为 0NCU/ml，无菌定量分装，2~8 $^{\circ}$ C 保存。

C.7 校准品 2~校准品 6

用校准品稀释液将标准阳性血清根据抗体剂量值按比例分别稀释为 10NCU/ml、20NCU/ml、40NCU/ml、100NCU/m 和 200NCU/ml，分别无菌定量分装，2~8 $^{\circ}$ C 保存。

C.8 25 倍浓缩洗涤液

称取磷酸氢二钠（含 12 个结晶水）60g、磷酸二氢钾 4g、氯化钠 160g、氯化钾 4g，加入 800ml 双蒸水搅拌溶解，再加入 400 μ l PROCLIN-300、10ml 的吐温-20，而后加双蒸水定容至 1000ml。

C.9 化学发光底物 A

称取 24.23g 三羟甲基氨基甲烷溶于 800ml 纯水中，充分搅拌均匀，用 HCl 调节 pH 值至 8.0。加入 0.026g 鲁米诺干粉，待其完全溶解后，加入 0.086g 羟基香豆素，而后加双蒸水定容至 1000ml，2~8℃ 保存。

C.10 化学发光底物 B

称取 15.42g 醋酸铵溶于 800ml 纯水中，使用冰醋酸调 pH 值至 5.2，加入 0.021g 维生素 C，待其完全溶解后，加入 0.066g 氨基酸氧化酶，而后加纯化水定容至 1000ml，2~8℃ 保存。

中国兽医协会
CVMA