ICS 11.220

B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA X39—2019

小反刍兽疫病毒抗体双抗原夹心 ELISA 检测方法

Double antigen sandwicht ELISA for Detection of Peste Des Petits Ruminants Virus Antibody

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。

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、洛阳现代生物技术研究院有限公司、山东省动物疫病预防与控制中心、甘肃省动物疫病预防控制中心、内蒙古自治区动物疫病预防控制中心、新疆维吾尔自治区动物疫病预防控制中心、广东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、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。

本标准主要起草人：孙雨、才学鹏、宋晓晖、王传彬、李秀梅、王睿男、杨林、刘近、赵晓春、肖颖、田夫林、蒋菲、王贵升、王文、曹丽萍、林汉亮、央珍、肖开提.阿不都克里木、曾邦权、邹联斌、康文彪、魏润生、韦正吉、阳爱国、陈冬、甘平、李硕、韩焘、赵柏林、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、蔺晓月、薛瑞雪、李玉杰、林琳、孙彦伟、林乃锋、张志鹏、原小燕、吕园园、任雪建、张军玲、曲萍、徐琦、胡冬梅、周智、赵柏林、孙圣福、杨天意、孙航、陈静、拉巴次仁、格桑卓玛、巴桑德吉、卓玛央吉。

中国兽医协会 CVMA

小反刍兽疫病毒抗体双抗原夹心 ELISA 检测方法

1 范围

本标准规定了小反刍兽疫病毒抗体的双抗原夹心 ELISA 检测方法。

本标准适用于双抗原夹心 ELISA 法检测动物血清中的小反刍兽疫抗体，可以动态监测抗体消长变化，适用于评估养殖场小反刍兽疫疫苗免疫状况，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 小反刍兽疫病毒 pET-30a-(N)蛋白和 pET-32a-(N)蛋白，见附录 A。

3.6 酶结合物，见附录 B。

3.4 阴性对照，见附录 C.1。

3.5 阳性对照，见附录 C.2。

3.2 包被缓冲液，见附录 D.1。

3.3 封闭液，见附录 D.2。

3.7 酶结合物稀释液，见附录 D.3。

3.8 样品稀释液，见附录 D.4。

3.9 25 倍浓缩洗涤液，见附录 D.5。

3.10 显色液 A，见附录 D.6。

3.11 显色液 B，见附录 D.7。

3.12 终止液，见附录 D.8。

4 器材与设备

4.1 酶标仪。

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 酶联反应板。

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 技术原理

包被板上包被的小反刍兽疫病毒（PPRV）抗原，可与待测样品中的特异性抗体反应，形成抗原-抗体复合物，再加入酶标记的抗原，则形成免疫复合物，洗涤后，如待测样品中含有PPRV抗体，显色深，为阳性，反之为阴性。

6 实验前准备工作

6.1 样本采集及处理

采集静脉血时，每只羊使用一个注射器。进行颈部静脉采血，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。

6.2 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。

7 操作步骤

7.1 包被

用0.05M pH值9.0的碳酸盐包被缓冲液将提取的N重组抗原稀释至蛋白含量为1μg/ml。在酶标板的每个反应孔中加100μl，4℃过夜。

7.2 洗板

弃去孔内溶液，用洗涤缓冲液（1×）洗板5次，将板拍干。

7.3 封闭

每孔加入150μl封闭液，置于4℃封闭16-24h。

7.4 洗板

弃去封闭液，在吸水纸上拍干。

7.5 干燥

置于37℃干燥3-5h。装入铝箔袋，加干燥剂，抽真空，置于2℃～8℃保存备用。

7.6 样品稀释准备

用样品稀释液10倍稀释待检样品（例如：10μL样品加90μL样品稀释液）。

7.7 加样

取出包被板，所有检测孔中加入 90μL 样品稀释液，然后加入 10μL 样品、阴性对照、阳性对照。对照孔每次检测两孔，振荡混合均匀。

7.8 温育

置37℃恒温培养箱中温育30分钟（±1分钟）。

7.9 洗板

将各孔的液体弃入废液筒，用280μL（±20μL）洗涤液洗涤板孔，共洗涤5次，每次洗涤后应弃去孔内的液体。最后一次洗涤液弃去后，将孔中残留的洗涤液在吸水纸上拍干。

7.10 加入酶结合物

中国兽医协会 CVMA

每孔加入100μL酶结合物。

7.11 温育

置37℃恒温培养箱中温育30分钟（±1分钟）。

7.12 洗板

将各孔的液体弃入废液筒，用280μL（±20μL）洗涤液洗涤板孔，共洗涤5次，每次洗涤后应弃去孔内的液体。最后一次洗涤液弃去后，将孔中残留的洗涤液在吸水纸上拍干。

7.13 加入底物

每孔加入50μL显色液A和50μL显色液B（也可显色液A、B等比例混匀后加100μL）。

7.14 温育

置37℃恒温培养箱中温育15分钟（±1分钟）。

7.15 终止

每孔加入50μL终止液，终止反应。

7.16 读值

酶标仪测量并且记录样品和对照的OD值(450nm)，15min内读值有效。

8 试验成立条件

阴性对照平均值（NC ）　　NC =(NC1+NC2)/2

阳性对照平均值（PC ）　　PC =(PC1+PC2)/2

试验成立判断标准：PC －NC ≥0.4。

9 结果判定

样品的计算　　S/P=样品/ PC

如果S/P值＜0.2，样品应判定为抗体阴性。

如果S/P值≥0.2，样品应判定为抗体阳性。

附录 A

（规范性附录）

小反刍兽疫病毒 pET-30a-(N)蛋白和 pET-32a-(N)蛋白的制备

A.1 生产用菌液繁殖

分别将生产用菌种种子pET-30a-(N)-BL21(DE3)按1:100比例转接含卡那霉素(100μg/ml)，将生产用菌种种子pET-32a-(N)-BL21(DE3) 按1:100比例转接含氨苄青霉素(100μg/ml)的LB液体培养基中，置37℃培养至OD600nm值为0.6，收集菌液。

A.2 重组蛋白的诱导表达

将生产用菌液加入IPTG至终浓度为0.75mmol/ml，16℃下继续诱导12小时，收集诱导表达菌液。

A.3 重组蛋白提取和纯化

将诱导后的菌液，在2～8℃条件下、以8000r/min离心10分钟，弃上清，收集菌体沉淀，用PBS（0.01mol/L，pH值7.4）洗菌体沉淀三次，以8000r/min离心10分钟，用6ml PBS（0.01mol/L，pH值7.4）重悬菌体沉淀，在150W功率的超声波的作用下冰浴裂解，有效时间为10分钟，工作时间为5秒，间隔5秒。将超声裂解物在2～8℃、以12000r/min离心15分钟，保留上清。

将制备的上清穿过预处理过的树脂柱，重复5～7次，依次用10mmol/l咪唑缓冲液、20mmol/l咪唑缓冲液、40mmol/l咪唑缓冲液、60mmol/l咪唑缓冲液、80mmol/l咪唑缓冲液、100mmol/l咪唑缓冲液、200mmol/l咪唑缓冲液及500mmol/l咪唑缓冲液对重组蛋白进行洗杂和洗脱，收集洗脱液，并洗脱产生的滤液通过Superdex200凝胶柱分子筛进行进一步精细纯化，最后将纯化后的蛋白吸出加到透析袋中（8kd）浸泡在2l的透析液中，过夜透析，-70℃保存。

中国兽医协会 CVMA

附录 B

（规范性附录）

小反刍兽疫病毒重组蛋白的 HRP 标记及纯化(酶结合物的制备)

B.1 称取 5mg HRP 溶解于 1ml 蒸馏水中。

B.2 于上述溶液中加入 0.2ml 新配的 0.1mol/L NaIO4 溶液，室温下避光搅拌 20 分钟。

B.3 将上述溶液装入透析袋中，使用 1mmol/L 的醋酸钠缓冲液（pH 值 4.4）透析，2～8℃过夜。

B.4 立即加入 10mg 小反刍兽疫病毒 N 蛋白在 1ml 碳酸盐缓冲液中（0.01mol/L），室温避光轻轻搅拌 2 小时。

B.5 加新配的 NaBH4 溶液（4mg/ml）0.1ml，混匀，置 2～8℃ 2 小时。

B.6 将上述溶液装入透析袋中， PBS 缓冲液（0.01mol/L，pH 值 7.2）透析，2～8℃过夜。

B.7 称取 100g 硫酸铵，加入 90ml 水加热溶解，然后放在室温冷却，等待硫酸铵结晶析出稳定后，加氨水调 pH 值至 7.6，然后在透析后的辣根过氧化物和抗体反应液中，边搅拌边逐滴加入等体积饱和硫酸铵，置 2～8℃静置 3 小时。

B.8 以 8000r/min 离心 30 分钟，弃上清。沉淀物用 1mlPBS 缓冲液（0.01mol/L，pH 值 7.2）溶解，最后边摇晃边逐滴加入 0.5ml 饱和硫酸铵，使其终浓度达到 33%，置 2～8℃静置 3 小时，以 8000r/min 离心 30 分钟，弃上清，沉淀用 1ml PBS（0.01mol/L，pH 值 7.2）溶解。将上述溶液装入透析袋中，用 PBS 缓冲液（0.01mol/L，pH 值 7.2）透析，去除铵离子后（用萘氏试剂检测），以 8000r/min 离心 30 分钟去除沉淀，上清液即为小反刍兽疫病毒酶标抗原，分装后，-70℃以下保存备用。

中国兽医协会 CVMA

附录 C

（规范性附录）

阴性对照和阳性对照的制备

C.1 阴性对照的制备

C.1.1 采血 对 1 头健康羊进行颈部静脉大量采血。

C.1.2 制备血清 室温（15～25℃）待血液凝固后，37℃静置 2 小时后，然后 2～8℃静置 1 小时，将析出的血清转移到离心瓶中，以 2000r/min 离心 5 分钟，收集上清。

C.1.3 血清的分装及保存 将制备的血清混合均匀后，0.22μm 滤膜过滤除菌，将血清与冻干保护剂按 8.5∶1 比例混匀，无菌定量分装，1ml/瓶，冷冻真空干燥，置-70℃以下保存，标记为“小反刍兽疫病毒阴性血清”，同时注明制备日期等信息。

C.2 阳性对照的制备

C.2.1 免疫与采血 用小反刍兽疫活疫苗于每只小反当兽疫抗体明性亲耳背后肌肉注射，2ml / 头份。免疫后 1 周，每周无菌采血，用 IDVET 商品化的小反刍兽疫抗体检测试剂盒检测，当抗体效价达 1：512 时，无菌采集免疫羊血液。

C.2.2 分装、冻干及保存 将制备的血清混匀后，经 0.22μm 滤膜过滤除菌，将血清与冻干保护剂按 8.5∶1 比例混匀，无菌定量分装，1ml/瓶，冷冻真空干燥，置-70℃下保存，标记为“小反刍兽疫阳性血清”，同时注明制备日期等信息。

中国兽医协会 CVMA

附录 D

（规范性附录）

相关试剂的配制

D.1　包被缓冲液

准确称取 1.59g 碳酸钠、2.93g 碳酸氢钠，量取 1000ml 纯化水，使用搅拌器搅拌使其完全溶解，使用酸度计测定 PH 值（要求 PH 9.6-9.8）。

D.2　封闭缓冲液

称取 2.9g 磷酸氢二钠、0.2g 磷酸二氢钾、8g 氯化钠、0.2g 氯化钾，量取 1000ml 纯化水，搅拌溶解，使用酸度计测定 PH 值（要求 PH 值 7.2-7.4），再称取牛血清白蛋白 20g，蔗糖 50g，加入其中，搅拌溶解后，再加入 0.5ml ProClin-300，0.5ml 吐温-20，搅拌混匀。

D.3　酶结合物稀释液

加入 2.9g 磷酸氢二钠、0.2g 磷酸二氢钾、8g 氯化钠、0.2g 氯化钾，量取 1000ml 纯化水，搅拌溶解，使用酸度计测定 PH 值（要求 PH 值 7.2～7.4），再称取牛血清白蛋白 10g 加入其中，搅拌溶解后，再加入 0.5ml ProClin-300，0.5ml 吐温-20，搅拌混匀。

D.4　样品稀释液

称取 Na2HPO4·12H2O 2.9g、KH2PO4　0.2g、NaCl 8g、KCl 0.2g，加入 800ml 双蒸水搅拌溶解，加入 BSA 10g、ProClin300 1ml、吐温 1ml，用双蒸水定容至 1000ml，过滤除菌。

D.5 25 倍浓缩洗涤液

称取 Na2HPO4•12H2O 72.5g、KH2PO4 5g、NaCl 200g、KCl 5g，加入 700ml 双蒸水加热搅拌溶解，再加入 12.5ml 的吐温-20，而后加双蒸水定容至 1000ml。使用前将 25 倍浓缩洗涤液用蒸馏水或去离子水 25 倍稀释。1 份 25 倍浓缩洗涤液加 24 份蒸馏水。例如：40mL25 倍浓缩洗涤液加入 960mL 蒸馏水。

D.6 显色液 A

称取柠檬酸 5.76g、过氧化脲 0.5g、乙酸钠 6.21g，加入 800ml 纯化水搅拌溶解，再加入 ProClin 300ml 1ml，而后加纯化水定容至 1000ml，定量分装，2～8℃保存。

D.7 显色液 B

称取柠檬酸 5.76g、TMB 0.2g，加入甲醇 100ml 溶解，再加入 ProClin 300ml 1ml，最后加纯化水水定容至 1000ml，定量分装，2～8℃保存。

D.8 终止液

量取纯化水 876ml，缓慢加入浓硫酸（2mol/L）124ml，搅拌均匀，而后加纯化水定容至 1000ml，定量分装，2～8℃保存。

中国兽医协会
CVMA