ICS 11.220

B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA X33—2019

猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体化学发光免疫分析检测方法

Chemiluminescent Immunoassay for Detection of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome 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。

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、中国农业大学、洛阳现代生物技术研究院有限公司、洛阳莱普生信息科技有限公司

本标准主要起草人：杨林、杨汉春、李秀梅、王传彬、盖新娜、刘近、周智、耿玉静、吕园园、任雪建

中国兽医协会
CVMA

猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体化学发光免疫分析检测方法

1 范围

本标准规定了猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体的化学发光免疫分析检测方法。

本标准适用于化学发光法检测猪血清或血浆中的猪繁殖与呼吸综合征抗体,适用于评估养殖场猪蓝耳疫苗免疫状况，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 猪繁殖与呼吸综合征病毒重组蛋白，见附录 A。

3.2 酶结合物，见附录 B。

3.3 包被缓冲液，见附录 C.1。

3.4 封闭液，见附录 C.2。

3.5 酶结合物稀释液，见附录 C.3。

3.6 校准品稀释液，见附录 C.4。

3.7 校准品 1～校准品 6，见附录 C.5。

3.8 25 倍浓缩洗涤液，见附录 C.6。

3.9 化学发光底物 A，见附录 C.7。

3.10 化学发光底物 B，见附录 C.8。

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，每头猪使用一个注射器。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

使用包被缓冲液将猪繁殖与呼吸综合征病毒蛋白稀释。每孔加100μl。置于4℃包被16～24h。

6.2　洗板

弃去包被液，使用280～300μl的洗涤液洗板2次。

6.3　封闭

每孔加入150μl封闭液，置于4℃封闭16～24h。

6.4　洗板

弃去封闭液，在吸水纸上拍干。

6.5　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。

6.6　加样

取出包被板。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 1～6 各 30μL，其余各孔依次加入待检样品各 30μL，再向以上各孔均加入 60μL 酶结合物，震荡混匀；每孔吸取 75μL 转移至包被板对应孔内。

6.7　温育

置37℃恒温培养箱中温育30分钟（±1分钟）。

6.8　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。

6.9　加入底物

每孔加入50μL的化学发光底物A和50μL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100μL）

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、10NCU/ml、20NCU/ml、50NCU/ml、100NCU/ml、200NCU/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，即可得出样品中猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体剂量值。

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≥0.99，试验成立。否则，应重新检测。

9　结果判定

当样品的抗体剂量值＜40NCU/ml，样品应判定为猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体阴性；如果样品的抗体剂量值≥40NCU/ml，则该样品判定为猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体阳性。

中国兽医协会
CVMA

附录 A

（规范性附录）

猪繁殖与呼吸综合征病毒重组蛋白 P28-N 的制备

A.1 重组表达质粒的制备及鉴定

生产用菌液繁殖将生产用细菌种子按 1：100 比例转接含 Kan+的 LB 液体培养基中，置 37℃培养至 OD600nm 值为 0.65，收集菌液，提取质粒并进行双酶切鉴定。挑取单个卡那霉素（Kan）抗性转化子，接种含 Kan 的 LB 培养基，过夜培养，用碱裂解法提取质粒。采用特异性引物进行 PCR 扩增，电泳鉴定扩增片段；用双酶切重组质粒，电泳检查插入片段的大小；并进行序列测定。

A.2 基因工程重组表达菌的诱导表达

将鉴定后的重组表达质粒转化 BL21(DE3)感受态细胞，利用 Kan 抗性筛选重组转化子。进行靶蛋白的诱导表达及 SDS-PAGE 分析。

A.3 可溶性重组蛋白 P28-N 的纯化

将 25℃ 诱导培养 4 h 的重组菌 200 mL 离心后，按约 1 :10（M/V）的比例加入预冷的含 1 %Triton X-100，1 mmol/L PMSF，2 mmol/L DTT。500 mmol/L NaCl 的 20 mL 磷酸盐缓冲液（pH8.0），超声裂解、离心处理的上清经 0.22 μm 的滤器过滤后，加入 1 mL 镍亲合层析基质，装柱 4℃ 作用 30 min。依次用 10～20 倍柱床体积、含 10 mmol/L 咪唑和 20 mmol /L 咪唑，500 mmol/L NaCl 的磷酸盐缓冲液洗涤 3 次；并用考马斯亮兰 G-250 检测试剂（Bradford 法）间隔检测洗脱液。再用含 100～500 mmol/L 咪唑的磷酸盐缓冲液洗脱含 His-tag 的重组蛋白 P28-N，分管收集，洗脱流速控制在 5 ～ 7 mL/h。

SDS-PAGE 检验纯化蛋白的纯度，合并仅有目的蛋白的收集管，经分子截量 3 kD 的蛋白浓缩管（YM-3 型，Millipore 产品）浓缩后，4℃下磁力搅拌 PBS 液快速透析 4 h，收集蛋白-70℃ 保存。

中国兽医协会 CVMA

附录 B

（规范性附录）

猪繁殖与呼吸综合征病毒酶标单克隆抗体的制备

B.1 单克隆抗体的制备

B.1.1 用 HT 选择培养液将阳性杂交瘤细胞依次稀释至细胞密度为 20 个/mL、10 个/mL、5 个/mL；再将经过稀释的细胞悬液加入含饲养细胞的 96 孔细胞培养板中，每孔 100 μL，每一个密度的细胞加 32 个孔；每天观察细胞生长情况，记录各孔细胞生长进度和融合细胞是否单克隆，选择单克隆生长的细胞孔，检测其上清，阳性孔再次进行克隆化，直至细胞可稳定分泌抗体；获得稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株后，及时扩大培养，选择处于对数生长期的细胞，轻轻将细胞从瓶壁上吹下。1000 r/min 离心 10 min，弃上清。用冻存液将细胞沉淀悬浮，细胞密度为 106～107 个/mL，分装于细胞冻存管中，每管 1 mL，加盖封严，注明细胞名称、冻存日期。用多层棉花将冻存管包裹后转入-80℃冰箱过夜，再移入液氮罐内长期保存。

B.1.2 小鼠腹水制备选取 12～16 周龄健康雄性 Balb/c 小鼠，每只腹腔注射灭菌石蜡油 0.5 mL，分多点注射；10～14 天后，将状态良好的杂交瘤细胞从细胞培养瓶内轻轻吹下，1000 r/min 离心 10 min，弃上清，用无菌 PBS 悬浮，计数备用；每只小鼠腹腔注射杂交瘤细胞 5×105～1×106 个，注射后轻柔小鼠腹部，使细胞均匀分散于小鼠的腹腔中；7～10 天后，可见小鼠腹部明显增大，采集腹水；将腹水 3000 r/min 离心 10 min，收集上清，-20 ℃保存备用。

B.2 单克隆抗体的纯化

利用 F.奥斯伯等（1998）介绍的辛酸-饱和硫酸铵法纯化单克隆抗体腹水。首先取腹水 10 mL，加入 0.06 mol/L 醋酸钠-醋酸缓冲液（pH4.0）20 mL；用 1 mol/L 氢氧化钠将腹水的 PH 调到 4.8 后，边搅拌边加入正辛酸 0.33 mL，室温搅拌 30 min；10000 rpm 离心 30 min，弃沉淀，上清用 1 mol/L 氢氧化钠将 PH 调到 7.2，缓慢加入饱和硫酸铵，边加边搅拌，使之达到 50%饱和度。室温搅拌 30 min，经过 10000 rpm 离心 30 min，弃去上清，将沉淀溶于 5.5 mL 的 PBS 中；缓慢加入 4.5 mL 饱和硫酸铵，边加边搅拌，使之饱和度达到 45%，不断搅拌 30 min，10000 rpm 离心 30 min，将沉淀溶于 2 mL 的 PBS 中，移入透析袋中进行透析；透析 24 h，在此期间要换液 3～4 次，收集后于-20℃保存备用。

B.3 单克隆抗体的 HRP 标记

B.3.1 称取 5mg HRP 溶解于 1ml 蒸馏水中。

B.3.2 于上述溶液中加入 0.2ml 新配的 0.1mol/L $NaIO_4$ 溶液，室温下避光搅拌 20 分钟。

B.3.3 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.3.4 立即加入 7mg 抗猪伪狂犬 gB 重组蛋白的单克隆抗体，在 1ml 碳酸盐缓冲液中（0.01mol/L），室温避光轻轻搅拌 2 小时。

B.3.5 加新配的 NaBH4 溶液（4mg/ml）0.1ml，混匀，置 2～8℃ 2 小时。

B.3.6 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.3.7 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.3.8 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，上清液即为抗猪伪狂犬病毒的酶标单克隆抗体，分装后，-70℃以下保存备用。

B.4 酶标单克隆抗体的制备

将 HRP 标记好的单克隆抗体进行无菌定量分装，-70℃以下保存。

中国兽医协会 CVMA

附录 C

（规范性附录）

相关试剂的配制

C.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）。

C.2　封闭液

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。

C.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。

C.4 校准品稀释液

取 PBS 800ml，加入牛血清白蛋白 10 g，PROCLIN-300 500μl、吐温-20 1ml，而后加入 PBS 容至 1000ml，过滤除菌，2～8℃保存。

C.5　校准品 1～校准品 6

用校准品稀释液将阴性质控血清按 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℃保存。

用校准品稀释液将标准阳性血清根据抗体剂量值按比例稀释为 10NCU/ml、20NCU/ml、40NCU/ml、100NCU/ml 和 200NCU/ml，分别无菌定量分装，2～8℃保存。

C.6 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。

C.7 化学发光底物 A

称取 24.23gTris 溶于 800ml 纯水中，充分搅拌均匀，使用盐酸调节 pH 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，而后加纯化水定容至 1000ml，2～8℃保存。

C.8 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