ICS 11.220

B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA X42—2019

猪伪狂犬病毒 gE 抗体化学发光免疫分析检测方法

Chemiluminescent Immunoassay for Detection of Pseudorabies gE 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、武汉科前生物股份有限公司、洛阳现代生物技术研究院有限公司、河南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、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、四川省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、黑龙江省动物疫病预防控制中心、广东省动物疫病预防控制中心、重庆市动物疫病预防控制中心、江西省动物疫病预防控制中心。

本标准主要起草人：孙雨、王传彬、徐高原、谢彩华、李秀梅、宋晓晖、蒋菲、王睿男、赵晓春、肖颖、杨林、曹丽萍、央珍、魏润生、康文彪、但汉并、田夫林、王贵升、曾邦权、邹联斌、韦正吉、林汉亮、王文、甘平、阳爱国、陈冬、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、党安坤、任雪建、吴彬、刘近、薛瑞雪、董浩、吕园园、耿玉静、李硕、韩焘、毕一鸣、曲萍、徐琦、胡冬梅、杨志、刘明瑞、杨天意、孙航、闫若潜、赵雪丽、孙圣福。

中国兽医协会 CVMA

猪伪狂犬病毒 gE 抗体化学发光免疫分析检测方法

1 范围

本标准规定了猪伪狂犬病毒 gE 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伪狂犬病毒 gE 抗体，其可以作为检测猪伪狂犬病野毒株感染的指标，并可用于鉴别临床野毒感染猪和用 gE 基因缺失疫苗免疫的猪。

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 猪伪狂犬病病毒 gE 重组蛋白，见附录 A。

3.2 猪伪狂犬病毒 gE 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 封闭液，见附录 C.2。

3.6 酶结合物稀释液，见附录 C.3。

3.7 阴性对照，见附录 C.4。

3.8 阳性对照，见附录 C.6。

3.9 25 倍浓缩洗涤液，见附录 C.7。

3.10 化学发光底物 A，见附录 C.8。

3.11 化学发光底物 B，见附录 C.9。

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～1000 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 技术原理

采用竞争反应原理，包被板上包被伪狂犬灭活病毒抗原，待检样品中的特异性抗体和酶标记抗体竞争性结合伪狂犬灭活病毒抗原，待检样品中抗体剂量值的高低与发光信号值成反比，通过校准曲线拟合计算，即可得出待检样品中抗体的剂量。

6 实验前准备工作

6.1 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。

6.2 血清样本的存放与运送

中国兽医协会 CVMA

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

用包被缓冲液将 0.3μg/mL的蛋白包被ELISA板，以100μl/孔的量加入酶标板中，置2～8℃包被24h。

7.2 洗板

弃去包被液，使用280～300μl的PBST洗板2次。

7.3 封闭

每孔加入150μl封闭液，置于37℃封闭2h。

7.4 干燥

弃去封闭液，在吸水纸上拍干。置于37℃干燥2h。装入铝箔袋，加干燥剂，抽真空，置于2℃～8℃保存备用。

7.5 加样

取出包被板（根据待检样品的多少，可将板条拆开分次使用），每孔加入25μL阴、阳性对照或待检样品（阴、阳性对照各加两孔，待检样品各一孔），再加入50μL酶结合物，振荡混匀。

7.6 温育

置37℃恒温培养箱中温育30分钟（±1分钟）。

7.7 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。

7.8 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）

7.9 静置

在15～25 ℃条件下避光静置5分钟。

7.10 读值

静置后15分钟内用化学发光仪读取发光值。

8 结果判定

8.1 成立条件

阴性对照平均值 NC$\overline{X}$=(NC1+NC2)/2

阳性对照平均值 PC$\overline{X}$=(PC1+PC2)/2

试验成立判断标准：NC$\overline{X}$ ≥10 PC$\overline{X}$ 。

8.2 结果判定描述

S/N值的计算　　S/N= S/NC$\overline{X}$

如果S/N值≤0.6，样品应判定为伪狂犬病毒gE抗体阳性。

如果S/N值＞0.6，样品应判定为伪狂犬病毒gE抗体阴性。

中国兽医协会 CVMA

附录 A

（规范性附录）

猪伪狂犬病病毒 gE 重组蛋白的制备

A.1 猪伪狂犬病病毒 gE 重组蛋白表达

将生产用基础种子接种于含有 Amp+（100 μg/mL）LB 固体培养基中，置 37℃培养过夜，挑取单菌落接种于含 Amp+（100μg/mL）LB 液体培养基，置 37℃摇床振荡培养至 OD 600nm 达到 0.65，取 1mL 菌液作为诱导前对照，随后再加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L，继续诱导 5 小时。收集培养菌液，在 4℃条件下、以 5000 r/min 离心 5 分钟，留取 100μL 上清，收集菌体沉淀，加入相同体积 2×SDS-PAGE Loading Buffer，充分涡旋混匀，100℃煮沸 5 分钟后，在 4℃条件下、以 10000 r/min 离心 1 分钟，取 5μL 进行 10%的 SDS-PAGE 电泳，确定在 27 kDa 表达出目的蛋白，用 Western blot 方法分析重组蛋白的抗原性。

A.2 猪伪狂犬病病毒 gE 重组蛋白纯化

A.2.1 将诱导后的菌液以 10000 r/min 离心 2 分钟，将菌体沉淀用适量的超声破菌缓冲液（20 mmol/L Tris-HCl pH 值 8.0、0.5 mol/L NaCl、1 mmol/L EDTA、1 mg/mL 溶菌酶）重悬后，超声破碎，功率为 300W，占空比 50%，每个循环 30 秒，总时间 20 分钟。破碎后的匀浆，在 4℃条件下，以 10000 r/min，离心 2 分钟，取沉淀用于纯化重组蛋白。

A.2.2 重组蛋白纯化前洗涤

将沉淀用适量的包涵体洗涤缓冲液（20mmol/L Tris－HCl pH 值 8.0，0.5 mol/L NaCl，2 mol/L 脲素，2% Triton）重悬后，搅拌洗涤 20~30 分钟，在 4℃条件下，以 10000r/min 离心 15 分钟，弃上清。重复一次。再用适量的 50 mmol/L Tris pH 值 8.0 溶液洗涤一遍（以去除残留的 EDTA），在 4℃条件下，以 10000 r/min 离心 15 分钟，弃去上清液。

A.2.3 溶解

沉淀用适量的包涵体溶解缓冲液（20 mmol/L Tris－HCl pH 值 8.0，0.5 mol/L NaCl，8 mol/L 脲素，0.2 mmol/L DTT 或 100 mmol/L β-巯基乙醇，2%Triton）重悬，室温搅拌 5-6 小时或过夜。在 4℃条件下，以 10000 r/min 离心 15 分钟，收集上清液进行纯化。步骤如下：

A.2.3.1 取 1mL 镍琼脂糖凝胶 FF 预装柱，用 10mL 平衡缓冲液（50 mmol/L 磷酸缓冲液（pH 值 7.4），含 0.5mol/L NaCl，8mol/L 脲素，20mmol/L 咪唑）平衡，然后取破碎上清 10mL 以 0.5mL/min 上样，收集流出液。

A.2.3.2　用 15mL 平衡缓冲液洗去未吸附的样品，流速 1~2mL/min，收集流出液。

A.2.3.3　分别用含 50mmol/L 咪唑，100mmol/L 咪唑，200mmol/L 咪唑，500mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液（洗脱缓冲液：50mmol/L 磷酸缓冲液（pH 值 7.4），含 0.5mol NaCl，8mol/L 脲素，分别含 50mmol/L，100mmol/L，200mmol/L，500mmol/L 咪唑）分阶段洗脱，收集各浓度洗脱液洗脱峰。

A.2.3.4　用 5mL 平衡缓冲液平衡柱子，灌满 20%乙醇，封闭，以备下次使用。

A.2.3.5　将收集的洗脱液进行 SDS-PAGE 电泳，检测各洗脱峰蛋白纯度和分子量。

A.2.3.6　透析复性：将含有目的蛋白的洗脱液装入到透析袋中，按顺序分别置于 6mol/L 脲素缓冲液透析 8 小时，4mol/L 脲素缓冲液透析 8 小时，2mol/L 脲素缓冲液透析 8 小时，0mol/L 脲素缓冲液透析过夜，收集透析溶液，进行 SDS-PAGE 电泳分析，检验纯化效果。

A.2.4　浓度测定

纯化后的重组蛋白用核酸蛋白分析仪测定蛋白浓度，每毫升培养菌液表达的蛋白应不低于 0.05mg。

中国兽医协会
CVMA

附录 B

（规范性附录）

猪伪狂犬病毒 gE 酶标单克隆抗体的制备

B.1 单克隆抗体的制备

B.1.1 杂交瘤细胞繁殖

将生产用细胞株 6E9H7，用含有 15%胎牛血清的高糖型 DMEM 培养液（pH 值 7.0）制成细胞悬液，置 37℃、含 5% CO2 培养箱中培养，48～72 小时，细胞能够稳定分裂繁殖，可长成单层。

B.1.2 小鼠腹水制备

选取 12～16 周龄健康雄性 Balb/c 小鼠，按 0.5ml /只腹腔注射弗氏不完全佐剂，7～10 日后每只小鼠腹腔接种 1×106～5×106 个 6E9H7 株杂交瘤细胞，经 7～10 日后可见小鼠腹部明显膨大，无菌操作采集腹水。采集的腹水以 8000r/min 离心 10 分钟，弃去上层脂肪层，收集中层腹水，-70℃以下冻存备用。

B.2 单克隆抗体的纯化

采用辛酸--饱和硫酸铵沉淀方法，对制备的含有单克隆抗体的腹水进行纯化，纯化后的单克隆抗体无菌分装，-70℃以下保存备用。操作步骤如下：

B.2.1 腹水的预处理：将采集的腹水在 2～8℃条件下，以 8000r/min 离心 30 分钟，除去细胞残渣以及小颗粒物质。

B.2.2 向 1 份预处理过的腹水中加 2 份乙酸缓冲液（0.06mol/L，pH 值 值 5.0），用 0.1mol/L 的 HCl 调 pH 值至 4.5。

B.2.3 于室温搅拌下在 30 分钟内逐滴加入辛酸，按每毫升稀释前的腹水加 33μL，在 2～8℃静置 2 小时，以 8000r/min 离心 30 分钟，弃沉淀。

B.2.4 上清经砂芯漏斗过滤，加入 1/10 体积的 PBS（0.1mol/L，pH 值 7.4），用 1mol/L 的 NaOH 调 pH 值至 7.4。

B.2.5 在 2～8℃冰浴下静置 30 分钟，加入 0.277g/mL 的硫酸铵，45％的饱和度，静置 1 小时以上，以 8000r/min 离心 30 分钟，弃上清。

B.2.6 沉淀溶于 1/3 腹水体积的 PBS 中，2～8℃条件下置于 50～100 倍体积的上述 PBS 液中透析 12 小时，在 2～8℃条件下，以 8000r/min 离心 30 分钟，除去不溶性沉淀。

B.3 单克隆抗体的 HRP 标记及纯化

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 NaIO4 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

称取 Na2CO3 1.59 g、NaHCO3 2.93 g，加双蒸水 800mL，搅拌溶解，再加双蒸水定容至 1000mL。

C.2 封闭缓冲液

称取 Na2HPO4•12H2O 1.44g、KH2PO4 0.24g 、NaCl 8 g、 KCl 0.2g、BSA 10g、蔗糖 50g、400μl Proclin-300 加入其中，搅拌溶解，再加 PBS 溶液定容至 1000mL。

C.3 酶结合物稀释液

称取 Na2HPO4•12H2O 1.44g、KH2PO4 0.24g 、NaCl 8 g、 KCl 0.2g，加入 800mL 双蒸水搅拌溶解，再称取 BSA 15 g 加入，量取 Proclin-300 400μl、吐温-20 1mL、红色色素 0.1g 加入，而后加双蒸水定容至 1000mL，过滤除菌。

C.4 阴性对照

用阴性对照稀释液将制备的阴性血清按 1∶20 倍比例进行稀释，按照 0.5mL/管、1mL/管、2.5mL/管分装，2～8℃保存。

C.5 阴性对照稀释液

称取 Na2HPO4•12H2O 1.93g、NaH2PO4 0.38g 、NaCl 8.2 g、 KCl 3g，调 pH 至 7.0～7.4，再加入 BSA15g，400μl Proclin 300，0.1g 绿色色素加双蒸水定容至 1000mL。

C.6 阳性对照

用阳性对照稀释液将制备的阳性血清按 1∶20 比例进行稀释，按照 0.5mL/管、1mL/管、2.5mL/管分装，2～8℃保存。

C.7 阳性对照稀释液

称取 Na2HPO4•12H2O 1.93g、NaH2PO4 0.38g 、NaCl 8.2 g、 KCl 3g，调 pH 至 7.0～7.4，再加入 BSA15g，400μl Proclin 300，0.1g 红色色素加双蒸水定容至 1000mL。

C.8 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，而后加纯化水定容至 1000ml，2～8℃保存。

C.9　化学发光底物 B

称取 15.42g 醋酸铵溶于 800ml 纯水中，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