ICS 11.220

B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA X46—2019

山羊痘病毒属病毒抗体酶联免疫分析检测方法

ELISA for detection of capripoxvirus 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、华南农业大学、新疆维吾尔自治区动物疫病预防控制中心、伊犁哈萨克自治州动物疫病预防控制中心、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。

本标准主要起草人：孙雨、宋晓晖、王传彬、王睿男、赵明秋、李秀梅、王文、杨林、陈少渠、任雪建、林汉亮、刘近、李晓霞、王永生、陈荣贵、康文彪、曹丽萍、蒋菲、甘平、央珍、亢文华、刘瑞灿、吕园园、马晓艳、肖开提.阿不都克里木、李舵、乌那尔汗·吉斯汗、美热木古丽·巴依待拉提、魏润生、任娟、马伟、郭海燕、殷笑丹、杨天意、孙航、阿曼古丽、李龙、麦吉提。

中国兽医协会 CVMA

山羊痘病毒属病毒抗体酶联免疫分析检测方法

1 范围

本标准规定了山羊痘病毒属病毒抗体的酶联免疫分析检测方法。

本标准适用于酶联免疫法检测动物血清中的山羊痘病毒属抗体，可以动态监测抗体消长变化，适用于评估养殖场山羊痘病毒属疫苗免疫状况。

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 山羊痘病毒属病毒重组蛋白 N 抗原，见附录 A。

3.2 阴性对照，见附录 B.1。

3.3 阳性对照，见附录 B.2。

3.4 包被缓冲液，见附录 C.1。

3.5 封闭液，见附录 C.2。

3.7 酶结合物稀释液，见附录 C.3。

3.8 样品稀释液，见附录 C.4。

3.9 25 倍浓缩洗涤液，见附录 C.5。

3.10 显色液 A，见附录 C.6。

3.11 显色液 B，见附录 C.7。

3.12 终止液，见附录 C.8。

中国兽医协会 CVMA

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 实验前准备工作

5.1 样本采集及处理

采集静脉血时，每只牛使用一个注射器。建议进行静脉无菌采血，不少于2 mL。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2 h，4000 r/min离心10 min。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

中国兽医协会 CVMA

使用包被缓冲液将山羊痘病毒属病毒重组P32蛋白稀释至1μg/mL。每孔加100 μL。置于2~8℃包被16h。

6.2 洗板

弃去包被液，每孔加入280～300 μL的洗涤液，洗板2次。

6.3 封闭

每孔加入250 μL封闭液，置于2~8℃封闭16 h。

6.4 洗板

弃去封闭液，每孔加入280～300 μL的洗涤液，洗板1次，弃去洗涤液，并在吸水纸上拍干。

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 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）。

6.7 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。

6.8 温育

置37 ℃恒温培养箱中温育60分钟（±1分钟）。

6.9 洗板

将各孔的液体弃入废液筒，用280 μL（±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。

6.10 加酶结合物

用稀释液将HRP酶标记的抗牛二抗或者抗羊二抗稀释至工作浓度，向每反应孔加入100 μL。

中国兽医协会 CVMA

6.11 温育

置37 ℃恒温培养箱中温育30分钟（±1分钟）。

6.12 洗板

将各孔的液体弃入废液筒，用280 μL（±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。

6.13 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）。

6.14 静置和反应终止

在15～25 ℃条件下避光静置5分钟。每孔加入终止液100μL。

6.15 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。

7 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。

8 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。

中国兽医协会 CVMA

附录 A

(规范性附录)

山羊痘病毒属病毒重组蛋白 P32 抗原的制备

A.1 生产用菌液繁殖

分别将生产用菌种种子pET-32a-(P32)-BL21(DE3)按1:100比例转接含卡那霉素(100μg/ml),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

中国兽医协会 CVMA

附录 B

（规范性附录）

阴性对照和阳性对照的制备

B.1 阴性对照的制备

B.1.1 采血 对 1 头健康牛进行颈部静脉大量采血。

B.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。

B.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“山羊痘病毒属阴性血清”，同时注明制备日期等信息。

B.2 阳性对照的制备

B.2.1 免疫与采血 用山羊痘病毒属疫苗于每只山羊痘病毒属抗体阴性牛耳背后肌肉注射，2ml / 头份。免疫后 1 周，每周无菌采血检测，当抗体效价达 1：512 时，无菌采集免疫牛血液。

B.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“山羊痘病毒属阳性血清”，同时注明制备日期等信息。

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。

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　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。

C.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。

C.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。

C.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。

C.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