ICS 11.220

B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA X38—2019

小反刍兽疫病毒抗体化学发光免疫分析检测方法

Chemiluminescent Immunoassay for Detection of Peste Des Petits Ruminants Virus Antibody

2019- XX-XX 发布　　2019- XX-XX 实施

中　国　兽　医　协　会　发布

中国兽医协会 CVMA

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、中国农业科学院兰州兽医研究所、洛阳现代生物技术研究院有限公司、新疆维吾尔自治区动物疾病预防控制中心、甘肃省动物疫病预防控制中心、山西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、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、窦永喜、陈少渠、王睿男、肖颖、赵晓春、杨林、王文、曹丽萍、央珍、肖开提.阿不都克里木、刘近、蒋菲、康文彪、魏润生、曾邦权、邹联斌、韦正吉、李硕、韩焘、赵柏林、吕园园、林汉亮、李硕、原小燕、任雪建、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、刘明瑞、赵津子、任娟、薛文、李晓霞、亢文华、艾日登才次克、郭海燕、毕一鸣、马英、杨天意、孙航、张志鹏、马晓艳、乌那尔汗·吉斯汗、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化学发光免疫分析检测方法

1 范围

本标准规定了小反刍兽疫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。

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 小反刍兽疫病毒重组蛋白N抗原，见附录A。

3.2 小反刍兽疫病毒单克隆抗体，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 封闭液，见附录C.2。

3.6 酶结合物稀释液，见附录C.3。

3.7 校准品稀释液，见附录C.4。

3.8 校准品1～校准品6，见附录C.5～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。

中国兽医协会 CVMA

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，每只羊使用一个注射器。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

使用包被缓冲液将小反刍兽疫病毒重组N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，即可得出样品中小反刍兽疫抗体的含量。

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，R2≥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40 NCU/ml，样品应判定为小反刍兽疫病毒抗体阴性；如果样品中抗体含量≥临界值40 NCU/ml，则判定为小反刍兽疫病毒抗体阳性。

中国兽医协会 CVMA

附录 A

（规范性附录）

小反刍兽疫病毒重组蛋白 N 抗原的制备

A.1 生产用菌液繁殖

将生产用菌种种子按 1:100 比例转接含卡那霉素(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）

小反刍兽疫病毒酶标单克隆抗体的制备

B.1　小反刍兽疫病毒单克隆抗体的制备

B.1.1 杂交瘤细胞繁殖　将生产用小反刍单抗细胞株用含有 15%胎牛血清的高糖型 DMEM 培养液（pH 值 7.0）制成细胞悬液，置 5%CO2 培养箱中培养，48～72 小时，细胞能稳定分裂繁殖，长成单层。

B.1.2 小鼠腹水制备　采用体内诱生法制备单克隆抗体，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个杂交瘤细胞,经7～10 日后可见小鼠腹腔明显膨大，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.1.3 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定量分装，-70℃以下冻存备用。

B.2　单克隆抗体的 HRP 标记及纯化（酶结合物的制备）

称取 2mgHRP 溶解于 0.5ml 蒸馏水中，加入 0.5ml 新配的 0.06mol/L NaIO4 溶液，4℃避光 30 分钟。加入 160mmol/L 的乙二醇 0.5ml，室温 30 分钟。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 中透析，4℃搅拌过夜。透析液吸至 15ml 的离心管中，加 0.2ml 新配的 5mg/ml NaBH4 液，混匀，4℃放置 12 小时。将得到的产物用分子筛进行层析，把未和单抗结合的辣根过氧化物酶去除。

B.3　酶结合物的制备

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 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

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。

C.6　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.7 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.8　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.9　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