ICS 11.220

B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA X41—2019

猪伪狂犬病毒 gB 抗体化学发光免疫分析检测方法

Chemiluminescent Immunoassay for Detection of Pseudorabies gB 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、河南省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、江苏省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、江西省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、黑龙江省动物疫病预防控制中心、四川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。

本标准主要起草人：孙雨、王传彬、闫若潜、李秀梅、宋晓晖、蒋菲、肖颖、杨林、王睿男、赵晓春、曹丽萍、央珍、谢彩华、康文彪、魏润生、甘平、曾邦权、邹联斌、韦正吉、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、马震原、王淑娟、林琳、孙彦伟、林乃锋、韩焘、王华俊、吕园园、刘近、李硕、曲萍、杨志、任雪建、刘玉良、倪建强、刘洋、毕一鸣、张志鹏、王芳、杨天意、孙航、李凯、王岩保、闫西平。

中国兽医协会 CVMA

猪伪狂犬病毒 gB 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 gB 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 gB 抗体，可以动态监测抗体消长变化，适用于评估养殖场猪伪狂犬疫苗免疫状况。

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 猪伪狂犬病毒 gB 重组蛋白，见附录 A。

3.2 猪伪狂犬病毒 gB 单克隆抗体，见附录 B。

3.3 酶结合物，见附录 B。

3.4 封闭液，见附录 C.1。

3.5 包被缓冲液，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。

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 技术原理

采用竞争反应原理，包被板上包被gB重组蛋白，待检样品中的特异性抗体和酶标记抗体竞争性结合重组蛋白，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

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

将0.52 mg/ml的重组蛋白用包被缓冲液稀释为1∶4000，以100μl/孔的量加入发光板中，置2～8℃包被12小时。

7.2 洗板

弃去包被液，使用280～300μl的洗涤液洗板2次，甩掉孔中液体，拍干。

7.3 封闭

每孔加入150μl封闭液，置37℃封闭2小时。

7.4 干燥

弃去封闭液，在吸水纸上拍干。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。

7.5 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。

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、5NCU/ml、12NCU/ml、25NCU/ml、50NCU/ml、100NCU/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。将样品的发光值代入校准曲线计算，即可得出样品中猪伪狂犬病毒gB抗体剂量值。

9 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，试验不成立。

10 结果判定

将样品的发光值代入校准曲线计算，即可得出样品中伪狂犬病毒gB抗体的剂量值。如果样品中抗体剂量值＜临界值10 NCU/mL，样品判定为阴性；如果样品中抗体剂量值≥临界值10 NCU/mL，则判定为阳性。

中国兽医协会 CVMA

附录 A

（规范性附录）

猪伪狂犬 gB 重组蛋白的制备

A.1 猪伪狂犬 gB 重组蛋白的制备

将 E. coli-PRV-gB 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 10000r/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。收集菌液，提取重组蛋白并进行纯化。

中国兽医协会 CVMA

附录 B

（规范性附录）

猪伪狂犬病毒 gB 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.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分装，-70℃以下保存备用。

B.2 单克隆抗体的 HRP 标记及纯化

B.2.1 称取 5mg HRP 溶解于 1ml 蒸馏水中。

B.2.2 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.2.3 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.2.4 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.2.5 加新配的 NaBH4 溶液（4mg/ml）0.1ml，混匀，置 2～8℃ 2 小时。

B.2.6 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.2.7 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.2.8 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.3 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

50mM 碳酸盐缓冲液（15mM Na2CO3，34.9mM NaHCO3， PH 9.6）放置 4℃备用，保存期一周。

C.2 封闭缓冲液

十二水磷酸氢二钠 8.09 mM，磷酸二氢钾 1.46mM，氯化钠 136.89mM，氯化钾 2.68 mM，1.5%（m/v）BSA，蔗糖 175.28 mM。待以上试剂完全溶解之后，加入 PC300 2‰（V/V），置于 4℃保存。

C.3 酶结合物稀释液

称取磷酸氢二钠（含 12 个结晶水）1.93g、磷酸二氢钠（含 2 个结晶水）0.386g、氯化钠 8.2g，加入 800ml 纯化水搅拌溶解，再称取牛血清白蛋白 15 g 加入，量取 Proclin-300 2ml 加入，而后加纯化水定容至 1000ml，再加入 0.1‰的胭脂红色素，过滤除菌。

C.4 校准品稀释液

磷酸氢二钠 （含 12 个结晶水）1.44g、磷酸二氢钾 0.24g、氯化钠 8.0g、氯化钾 0.2g，加入 800ml 纯化水搅拌溶解，再加入牛血清白蛋白 10g、Proclin-300 500μl、吐温-20 1.0ml 加入，而后加纯化水定容至 1000ml，过滤除菌，2～8℃保存。

C.5 校准品 1

用校准品稀释液将制备的标准阴性血清按 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

用校准品稀释液将制备的标准阳性血清根据剂量值按比例分别稀释到 5NCU/ml、12NCU/ml、25NCU/ml、50NCU/ml、100NCU/ml，分别无菌定量分装，2～8℃保存。

C.7 25 倍浓缩洗涤液

称取磷酸氢二钠（含 12 个结晶水）60g、磷酸二氢钾 4.0g、氯化钠 160g、氯化钾 4.0g，加入 800ml 纯化水搅拌溶解，再加入 400μl Proclin-300、10ml 的吐温-20，而后加纯化水定容至 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