ICS 11.220

B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA X35—2019

口蹄疫病毒 A 型抗体化学发光免疫分析检测方法

Chemiluminescent Immunoassay for Detection of FMDV A 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、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疫病预防控制中心、河南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、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、山东省动物疫病预防与控制中心、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。

本标准主要起草人：孙雨、王传彬、宋晓晖、李秀梅、杨林、王睿男、肖颖、赵晓春、曹丽萍、蒋菲、康文彪、魏润生、林汉亮、王文、央珍、肖开提.阿不都克里木、曾邦权、邹联斌、韦正吉、李硕、刘近、吕园园、耿玉静、赵柏林、徐亚东、康新华、王文莉、顾贵波、贾俊元、徐峥嵘、郑红飞、豆玲、张莉、毋艳萍、任雪建、张志鹏、居马别克·夏拉巴依、田夫林、王贵升、党安坤、薛瑞雪、李舵、马英、韩焘、原霖、顾小雪、张硕、胡冬梅、毕一鸣、美热木古丽·巴依待拉提、苏晓慧、秦菊、杨天意、孙航、吴彬、闫若潜、谢彩华、马震原、王淑娟、王华俊、格桑央宗、德吉玉珍、边巴央拉、扎西卓玛。

中国兽医协会 CVMA

口蹄疫病毒 A 型抗体化学发光免疫分析检测方法

1 范围

本标准规定了口蹄疫 A 型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、牛、羊等动物血清中的口蹄疫 A 型病毒抗体，可以动态监测抗体消长变化，适用于评估养殖场口蹄疫疫苗免疫状况。

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 口蹄疫 VP1 重组蛋白，见附录 A。

3.2 口蹄疫 A 型单克隆抗体，见附录 B。

3.3 酶结合物，见附录 C。

3.4 包被缓冲液，见附录 D.1。

3.5 封闭液，见附录 D.2。

3.6 酶结合物稀释液，见附录 D.3。

3.7 样品稀释液，见附录 D.4。

3.8 校准品稀释液，见附录 D.5。

3.9 校准品 1～校准品 6，见附录 D.6～D.7。

3.10 25 倍浓缩洗涤液，见附录 D.8。

3.11 化学发光底物 A，见附录 D.9。

中国兽医协会 CVMA

3.12 化学发光底物B，见附录D.10。

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A型重组蛋白，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、牛或羊使用一个注射器。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VP1重组蛋白用包被缓冲液稀释到1.5μg/ml，以100μl/孔的量加入酶标板中，置2～8℃包被16小时。

7.2 洗板

弃去包被液，用25倍浓缩洗涤液稀释成1倍洗涤液，洗板2次。

7.3 封闭

每孔加入150μl封闭液，置于37℃封闭2小时。

7.4 洗板

弃去封闭液，在吸水纸上拍干。

7.5 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。

7.6 样品稀释

在血清稀释板中，用样品稀释液将待检样品按照1：20比例进行稀释。例如：3μl样品加57μl样品稀释液。

7.7 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 60μL，其余各孔依次加入待检样品各 60μL，再向以上各孔均加入 60μL 酶结合物，震荡混匀；每孔吸取 100μL 转移至包被板对应孔内。

7.8 温育

置37℃恒温培养箱中温育30分钟（±1分钟）。

7.9 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。

7.10 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）。

7.11 静置

在15～25 ℃条件下避光静置5分钟。

7.12 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、10NCU/ml、20NCU/ml、40NCU/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，即可得出样品中口蹄疫A型病毒抗体剂量值。

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，即可得出样品中口蹄疫A型病毒抗体的剂量值。如果样品中抗体剂量值＜临界值20 NCU/mL，样品判定为阴性；如果样品中抗体剂量值≥临界值20 NCU/mL，则判定为阳性。

中国兽医协会
CVMA

附录 A

（规范性附录）

包被抗原的制备

A.1 口蹄疫 VP1 重组蛋白的制备

A.1.1 生产用菌液繁殖

将生产用细菌种子按 1:100 比例转接含卡纳霉素（100μg/ml）LB 液体培养基中，置 37℃培养至 OD600nm 值约为 0.65，收集菌液。

A.1.2 重组蛋白的诱导表达

将生产用菌液加入终浓度为 1mmol/L 的 IPTG，继续诱导 6 小时，收集诱导表达菌液。

A.1.3 重组蛋白提取和纯化

将诱导后的菌液，在 2～8℃条件下、以 10000r/min 离心 3 分钟收集菌体，菌体沉淀用适量的超声破菌缓冲液（20mmol/L Tris-HCl pH 值 8.0、0.5mol/L 氯化钠、1mmol/L EDTA、1mg/ml 溶菌酶）重悬，超声破碎，功率为 300W，破碎 15 秒，间隔 15 秒，每个循环 30 秒，总时间 20 分钟。破碎后的匀浆在 2～8℃条件下、以 12000r/min 离心 2 分钟，取包涵体沉淀进行纯化，纯化后的产物即为包被抗原。

中国兽医协会 CVMA

附录 B

（规范性附录）

口蹄疫 A 型单克隆抗体的制备

B.1　杂交瘤细胞繁殖

将生产用细胞株 5E12D5，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.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 5E12D5 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，-20℃冻存备用。

B.3　单克隆抗体的纯化

采用辛酸饱和硫酸铵沉淀法，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，-20℃以下保存备用。

中国兽医协会 CVMA

附录 C

（规范性附录）

口蹄疫 A 型单克隆抗体 HRP 标记及纯化（酶结合物的制备）

C.1 单克隆抗体 HRP 标记及纯化

C.1.1 称取 5mg HRP 溶解于 1ml 蒸馏水中。

C.1.2 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。

C.1.3 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。

C.1.4 立即加入 6mg 口蹄疫 A 型单克隆抗体在 0.6ml 碳酸盐缓冲液中（0.01mol/L），室温避光轻轻搅拌 2 小时。

C.1.5 加新配的 NaBH4 溶液（4mg/ml）0.06ml，混匀，置 2～8℃ 2 小时。

C.1.6 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。

C.1.7 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。

C.1.8 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，上清液即为口蹄疫 A 型酶标单克隆抗体，无菌定量分装，-20℃以下保存，有效期为 24 个月。

C.2 酶结合物的制备

将制备的口蹄 A 型酶标单克隆抗体用酶结合物稀释液稀释成工作效价为 1:1500，加入 0.01%的胭脂红色素，搅拌均匀，无菌定量分装，置 2～8℃保存。

中国兽医协会 CVMA

附录 D

（规范性附录）

相关试剂的配制

D.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。

D.2　封闭缓冲液

10mM 三羟基氨基甲烷、26.4mM 海藻糖、0.1% (m/v)酪蛋白、146mM 蔗糖，待以上试剂完全溶解之后，加入 0.2% （v/v） PC300，调 pH 至 8.0，置于 4℃保存

D.3　酶结合物稀释液

16.2mM 十二水磷酸氢二钠、2.9mM 磷酸二氢钾、137mM 氯化钠、2.7mM 氯化钾，搅拌溶解，加入 0.1%(m/v)酪蛋白，6.48mM 氨基比林，0.91mM 硫酸庆大霉素，0.1%（v/v）曲拉通，0.1%（v/v）MIT，10% （v/v）兔血清，调 pH 至 7.4，过滤除菌。置于 4℃保存。成品试剂盒中需加入红色色素 0.01%，搅拌混匀。

D.4　样品稀释液

称取磷酸氢二钠（含 12 个结晶水） 2.9g、磷酸二氢钾 0.2g、氯化钠 8g、氯化钾 0.2g，加入 800ml 纯化水搅拌溶解，再称取 BSA 15g 加入，量取 PROCLIN- 300 1ml、吐温-20 1ml 加入，而后加纯化水定容至 1000ml，过滤除菌，无菌定量分装，2～8℃保存。

D.5　校准品稀释液

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

D.6　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。

D.7　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。

D.8　25 倍浓缩洗涤液

称取磷酸氢二钠（含 12 个结晶水） 72.5g、磷酸二氢钾 5g、氯化钠 200g、氯化钾 5g，加入 800ml

纯化水搅拌溶解，再加入 PROCLIN-300 1ml、吐温-20 25ml，而后加纯化水定容至 1000ml，定量分装，2～8℃保存。

D.9 化学发光底物 A

称取 24.23g Tris 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。

D.10 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