ICS 11.220

B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA X36—2019

口蹄疫病毒 O 型抗体化学发光免疫分析检测方法

Chemiluminescent Immunoassay for Detection of FMDV O 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、中国兽医药品监察所、中国科学院微生物研究所、洛阳现代生物技术研究院有限公司、吉林省动物疫病预防控制中心、甘肃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、江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、王传彬、赵启祖、李秀梅、宋晓晖、曹丽萍、蒋菲、肖颖、赵晓春、杨林、杨利敏、王睿男、康文彪、魏润生、刘文军、王文、林汉亮、肖开提.阿不都克里木、曾邦权、邹联斌、邹兴启、任雪建、朱元源、刘近、央珍、甘平、阳爱国、陈冬、韦正吉、李硕、韩焘、张志鹏、原小燕、徐亚东、康新华、王文莉、顾贵波、吕园园、杨志、贾俊元、徐峥嵘、郑红飞、豆玲、张莉、毋艳萍、耿玉静、曲萍、亢文华、李晓霞、刘玉良、赵柏林、徐琦、倪建强、刘洋、毕一鸣、汪葆月、格桑央宗、德吉玉珍、边巴央拉、扎西卓玛、杨天意、孙航。

中国兽医协会 CVMA

口蹄疫病毒O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O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O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O型病毒VP1重组蛋白，见附录A。

3.2 口蹄疫O型病毒酶标单克隆抗体，见附录B。

3.3 酶结合物，见附录B。

3.4 PBS，见附录C.1。

3.5 包被缓冲液，见附录C.2。

3.6 封闭液，见附录C.3。

3.7 酶结合物稀释液，见附录C.4。

3.8 样品稀释液，见附录C.5。

3.9 校准品稀释液，见附录C.6。

3.10 校准品1～校准品6，见附录C.7～C.8。

3.11 25倍浓缩洗涤液，见附录C.9。

3.12 化学发光底物 A，见附录 C.10。

3.13 化学发光底物 B，见附录 C.11。

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

本方法采用竞争原理，将口蹄疫O型VP1蛋白作为包被抗原，包被于化学发光反应板上，待检血清与酶标单抗同时加入到反应板中，二者竞争性的与VP1蛋白上的相应表位结合。最后加入化学发光底物，读取发光值，回算出口蹄疫O型抗体计量值，从而反应出猪血清中口蹄疫O型抗体含量，判断阴阳性结果。因此，待检血清中口蹄疫O型抗体的浓度与发光值成反比。

6 实验前准备工作

6.1 样本采集及处理

中国兽医协会 CVMA

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

将重组蛋白用包被缓冲液稀释为1μg/ml，以100μl/孔的量加入发光板中，置2～8℃包被16～24h。

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2～8℃封闭16-24h。

7.4 洗板

弃去封闭液，在吸水纸上拍干。

7.5 干燥

置于室温干燥20～24小时后。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

中国兽医协会 CVMA

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、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，即可得出样品中口蹄疫O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，$R^2 \geqslant 0.99$，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O型病毒抗体的剂量值。如果样品中抗体剂量值＜临界值15 NCU/mL，样品判定为阴性；如果样品中抗体剂量值≥临界值15 NCU/mL，则判定为阳性。

中国兽医协会
CVMA

附录 A

（规范性附录）

口蹄疫 O 型病毒 VP1 重组蛋白的制备

A.1　生产用菌液繁殖

将生产用细菌种子按 1:100 比例转接含 Amp+（100 μg/ml）LB 液体培养基中，置 37℃培养至 OD600nm 值为 0.65，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 1mmol/L，继续诱导 6 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 4℃条件下、以 5000 r/min 离心 10 分钟收集菌体，弃上清，收集菌体。收集菌体后每 100mg 菌体湿重加入 1～5ml 细菌裂解液，超声裂解菌体，进行蛋白纯化，纯化后的产物即为包被抗原口蹄疫 O 型病毒 VP1 重组蛋白。

中国兽医协会 CVMA

附录 B

（规范性附录）

口蹄疫 O 型病毒酶标单克隆抗体的制备

B.1　杂交瘤细胞繁殖

将生产用细胞株 4C5C8，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 1×10^6～5×10^6 个 4C5C8 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℃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。

B.4　单克隆抗体 HRP 标记

称取 2mgHRP 溶解于 0.5ml 蒸馏水中，加入 0.5ml 新配的 0.06M NaIO4 溶液，4℃避光 30 分钟。加入 160mM 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 Buffer 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 NaBH 4 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.5　酶结合物的制备

将制备的浓度为 1mg/ml 口蹄 O 型酶标单克隆抗体用酶结合物稀释液按 1:8000 稀释，搅拌均匀，无菌分装，12ml/瓶，置 2～8℃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 PBS

称取十二水磷酸氢二钠 3g、磷酸二氢钾 0.5g、氯化钠 8 g、氯化钾 0.5g，加双蒸水 800ml，搅拌溶解，再加入 500μl Proclin-300，而后加双蒸水定容至 1000ml。

C.2 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，pH 值应为 9.4～9.6。

C.3 封闭缓冲液

量取出 800ml 的 PBS 溶液，称取酪蛋白 10g、蔗糖 50g、500μl PROCLIN-300、0.5ml Tween-20 加入其中，搅拌溶解，再加 PBS 溶液定容至 1000ml。

C.4 酶结合物稀释液

取 PBS 800ml，加入牛血清白蛋白 10g，PROCLIN-300 500μl、吐温-20 1ml，而后加入纯化水定容至 1000ml，再加入 0.1‰的胭脂红色素，过滤除菌。

C.5 样品稀释液

称取磷酸氢二钠 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 10g 加入，量取 PROCLIN-300 500μl、吐温-20 1ml 加入，而后加纯化水定容至 1000ml，加入 0.1‰的果绿色素，过滤除菌，定量分装，2～8℃保存。

C.6 校准品稀释液

取 PBS800ml，加入 800ml 纯化水搅拌溶解，再加入 BSA10g，PROCLIN-300 500μl、吐温-20 1ml，而后加纯化水定容至 1000ml，加入 0.1‰的胭脂红，过滤除菌，无菌定量分装，2～8℃保存。

C.7 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.8 校准品 2～校准品 6

用校准品稀释液将标准阳性血清稀释成 10NCU/ml、20NCU/ml、50NCU/ml、100NCU/ml、200NCU/ml，分别为校准品 2、校准品 3、校准品 4、校准品 5、校准品 6。过滤除菌，定量分装，2～8℃保存。

C.9　25 倍浓缩洗涤液

称取十二水合磷酸氢二钾 60g、磷酸二氢钾 4g、氯化钠 160g、氯化钾 4g，加入 800ml 双蒸水搅拌溶解，再加入 400μlPROCLIN-300、10ml 的吐温-20，而后加纯化水定容至 1000ml，2～8℃保存。

C.10 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。

C.11 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