ICS 11.220
B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA 35-2020

猪瘟病毒抗体化学发光免疫分析检测方法

chemiluminescent immunoassay for detection of classical swine fever virus antibody

中国兽医协会
CVMA

2020-12-22 发布　　2020-12-22 实施

中 国 兽 医 协 会　发 布

前　　言

本文件按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

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。

本文件由中国兽医协会提出并归口。

本文件起草单位：中国动物疫病预防控制中心、中国兽医药品监察所、洛阳现代生物技术研究院有限公司、新疆生产建设兵团动物疫病预防控制中心、兆丰华生物科技（南京）有限公司北京生物医药科技中心、北京亿森宝生物科技有限公司、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。

本文件主要起草人：孙雨、王传彬、王琴、李秀梅、宋晓晖、赵晓春、肖颖、王睿男、蒋菲、杨林、刘奇、王美君、孙航、徐璐、张旭、赵启祖、张乾义、夏应菊、姚强、甘平、马英、李晓霞、毕一鸣、王新杰、孙晓明、凌洪权、武煊、彭强、张力、殷涛、刘颖昳、徐琦、胡冬梅、吕园园、任雪建、杨晓帆、邹兴启、朱元源、刘近、杨志、耿玉静。

中国兽医协会
CVMA

猪瘟病毒抗体化学发光免疫分析检测方法

1 范围

本文件规定了猪瘟病毒抗体化学发光免疫分析检测方法的试剂与材料、仪器与设备、技术原理、实验前准备工作、操作步骤、试验成立标准、结果判定标准等内容。

本文件适用于猪瘟病毒抗体的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范执行。

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 试剂与材料

4.1 猪瘟病毒 E2 重组蛋白，按照附录 A 制备

4.2 猪瘟病毒单克隆抗体，按照附录 B 制备

4.3 酶结合物，按照附录 B 制备

4.4 包被缓冲液，按照附录 C.1 配制

4.5 PBS，按照附录 C.2 配制

4.6 封闭液，按照附录 C.3 配制

4.7 酶结合物稀释液，按照附录 C.4 配制

4.8 校准品稀释液，按照附录 C.5 配制

4.9 校准品 1~校准品 6，按照附录 C.6~C.7 配制

4.10 25 倍浓缩洗涤液，按照附录 C.8 配制

4.11 化学发光底物 A，按照附录 C.9 配制

4.12 化学发光底物 B，按照附录 C.10 配制

5 仪器与设备

化学发光免疫分析仪、分析天平、洗板机、37 ℃温箱、2 ℃~8 ℃冰箱、－20 ℃冰箱、单道微量移液器（0.5 μL~10 μL；10 μL~100 μL；20 μL~200 μL；100 μL~1000 μL）、多道移液器（300 μL）、NUNC

反应板、血清稀释板（96 孔一次性 U 型血凝板或 96 孔细胞培养板）、一次性注射器（5 mL、10 mL）。

6 技术原理

采用竞争反应原理，包被板上包被 E2 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。

7 试验前准备工作

7.1 样本采集及处理

采集静脉血时，每只猪使用一个注射器。建议进行静脉无菌采血，不少于2 mL。室温静置于斜面2 h，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。

7.2 血清样本的保存与运输

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 ℃以下冷冻贮存。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。应符合NY/T 541的规定。

8 操作步骤

8.1 包被

将重组蛋白用包被缓冲液稀释至0.1 μg/mL，加入NUNC反应板中，100 μL/孔，置37 ℃包被3 h。

8.2 洗板

弃去包被液，用300 μL PBST洗涤板孔，洗板2次。每次洗涤后应弃去孔内的液体。最后一次洗涤液弃去后，将包被板在吸水纸上拍干，直至孔内无残留洗涤液。

8.3 封闭

每孔加入150 μL封闭液，置于37 ℃封闭2 h。弃去封闭液，在吸水纸上拍干。

8.4 干燥

置于37 ℃干燥3 h。装入铝箔袋，加干燥剂，抽真空，置于2 ℃~8 ℃保存备用。

8.5 加样

取出抗原包被板。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校准品各60 μL，其余各孔依次加入待检样品各60 μL，以上各孔每孔再加入60 μL 酶结合物，震荡混匀；每孔吸取100 μL转移至抗原包被板对应孔内。

8.6 温育

置37℃恒温培养箱中温育29 min~31 min。

8.7 洗板

取出反应板，弃去反应液。用300 μL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。在最后一次洗涤液弃去后，将包被板在吸水纸上拍干，直至孔内无残留洗涤液。

8.8 加入底物

每孔各加入50 μL的化学发光底物A和50 μL的化学发光底物B，振荡混匀（也可将化学发光底物A、B等比例混匀后加100 μL）。

8.9 静置

在15 ℃~25 ℃条件下避光静置5 min。

8.10 读值

静置后，在15 min内用化学发光仪读取发光值。

9 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（0 NCU/mL、10 NCU/mL、20 NCU/mL、40 NCU/mL、100 NCU/mL、200 NCU/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，即可得出样品中猪瘟病毒抗体的含量。

10 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，$R^2 \geq 0.99$，试验成立。否则，应重新检测。

11 结果判定

如果待测样品中抗体含量＜临界值20 NCU/mL，样品判定为猪瘟病毒抗体阴性；如果样品的抗体剂量值≥20 NCU/mL，样品判定为猪瘟病毒抗体阳性。

中国兽医协会 CVMA

附　录　A
（规范性）
猪瘟病毒 E2 重组蛋白的制备

A.1 生产用毒种的繁殖

取生长良好的 Sf9 细胞，将毒种按照约 1:100 的比例感染贴壁细胞，约 72 h 后待 70 %~80 %的细胞出现 CPE（增大或裂解）现象时，将细胞吹打下来，所收集的病毒液，即为生产用毒种。

A.2 包被抗原 E2 重组蛋白病毒液的制备

将 Sf9 细胞悬浮培养，初始接种密度应大于 5×10^5 个/mL，待细胞长至对数生长期时（细胞密度约 1×10^6 个/mL~2×10^6 个/mL），按 1%的比例接种生产用毒种，继续培养约 3 d 后，观察细胞增大并将要裂解之前，离心收集培养上清。

A.3 包被抗原 E2 重组蛋白的纯化

将培养上清进行透析后，用阳离子交换柱纯化（SP Sepharose Fast Flow）进行梯度洗脱，收集含有目标蛋白的组分，0.1 mol/L pH9.0 的 Tris-HCl 缓冲液调节 pH 值至 7.5，用 His-tag 柱亲和纯化（Ni Sepharose 6 Fast Flow），收集目标蛋白组分，并用 PB（20 mmol/L PB，150 mmol/L 氯化钠，pH 值 7.0）透析，置 -70 ℃以下保存备用。

中国兽医协会 CVMA

附　录　B
（规范性）
猪瘟病毒 E2 蛋白单克隆抗体的制备

B.1　猪瘟病毒 E2 蛋白单克隆抗体的制备

B.1.1 杂交瘤细胞繁殖

1C8 株杂交瘤细胞复苏后，用含 15 %胎牛血清的 DMEM 培养液制成细胞悬液，置 37 ℃、含 5 % CO2 培养箱中培养 5 代。收集每代次的细胞上清，进行梯度稀释，用包被猪瘟病毒 E2 蛋白（浓度为 0.25 μg/mL）的反应板进行检测，以 OD450nm 值≥1.0 的最高稀释倍数作为抗体效价，应不低于 1:100。

B.1.2 猪瘟病毒 E2 蛋白单克隆抗体小鼠腹水的制备

选取经产 BalB/C 雌鼠，按 0.5 mL/只腹腔注射无菌液体石蜡，7 d~10 d 后每只小鼠腹腔接种 $l\times10^6$ 个~5×10^6 个 1C8 株杂交瘤细胞，经 7 d~10 d 后可见小鼠腹部明显膨大，采集腹水。采集的腹水以 8000 r/min 离心 10 min，收集上清，弃沉淀，-70 ℃以下冻存备用。

B.1.3 猪瘟病毒 E2 蛋白单克隆抗体的纯化

B.1.3.1 1C8 腹水的脱脂

将收集的 1C8 腹水在 4 ℃条件下，以 10000 r/min 离心 10 min，吸取上清。每毫升腹水中加入 10 %硫酸葡聚糖钠盐溶液 40 μL 和 1mol/L 氯化钙溶液 1 mL。室温混合 15 min。在 4 ℃条件下，以 10000 r/min 离心 10 min，取上清。

B.1.3.2　脱盐

取 10 g Sephadex G50 层析介质，置于 500 mL 蒸馏水中充分浸泡，期间换液，弃去上层细粒。室温浸泡 24 h。将层析介质灌注于层析柱中，在灌注过程中应确保填充介质均匀，不能出现断层和气泡。

用 PB 上样缓冲液（20 mmol/L，pH 值 7.0）对层析柱进行平衡。平衡后，待液面恰好流入层析柱时，加入 1/10 柱体积的脱脂腹水。待腹水流入层析柱后，加入上样缓冲液进行淋洗。收集最大的蛋白峰（第 1 峰），即为脱盐腹水。然后继续淋洗层析柱，直至蛋白和盐离子全部流出后，层析柱再生，即可重复上样。

B.1.3.3　亲和层析

将亲和层析预装柱用上样缓冲液淋洗，直至预装柱中的原有液体全部流出。取 5 mL 收集的脱盐腹水上样，上样结束后，继续用上样缓冲液进行淋洗，待未结合的蛋白全部流出，且流出液中检测不到蛋白后，换成洗脱液（0.1 mol/L glucine-HCl，pH 值 2.7）进行淋洗，收集流出的第一个蛋白峰。将收集液中加入适当体积的 1 mol/L Tric-HCl 缓冲液，调节 pH 值。

B.1.3.4　透析

将纯化后的单抗装入透析袋内，置于 2 ℃~8 ℃冰箱中，用 10 倍体积的 0.01 mol/L PBS（pH 值 7.2～7.4）进行透析，期间换液 2 次~3 次。将透析后的蛋白保存于-40 ℃条件下备用。

B.2　单克隆抗体的 HRP 标记及纯化（酶结合物的制备）

B.2.1　HRP 的标记

称取 2 mg HRP 溶解于 0.5 mL 蒸馏水中，加入 0.5 mL 新配的 0.06 mol/L $NaIO_4$ 溶液，在 4 ℃条件下避光 30 min。加入 160 mmol/L 的乙二醇 0.5 mL，室温放置 30 min 后，加入纯化的单抗 2 mg，混匀。将上述溶液装入透析袋中，置 2000 mL 的 0.05 mmol/L CB Buffer 中透析，在 4 ℃条件下搅拌过夜。透析液吸至 15 mL 的离心管中，加 0.2 mL 新配的 5 mg/mL NaBH，溶液，混匀，再置在 4 ℃条件下 12 h。

B.2.2 游离 HRP 的去除

取 10 g Sephadex G50 层析介质，置于 500 mL 蒸馏水中充分浸泡，期间换液，弃去上层细粒。室温浸泡 24 h。将层析介质灌注于层析柱中，在灌注过程中应确保填充介质均匀，不能出现断层和气泡。

用 PBS 上样缓冲液（20 mmol/L，pH 值 7.0）对层析柱进行平衡。平衡后，待液面恰好流入层析柱时，加入 1/10 柱体积的标记单抗。待标记单抗流入层析柱后，加入上样缓冲液进行淋洗。收集最大的蛋白峰（第 1 峰），即为标记 HRP 的单克隆抗体。然后继续淋洗层析柱，直至游离的 HRP 的全部流出后，层析柱再生，即可重复上样。

B.3 酶结合物的制备

将酶标单抗用酶结合物稀释液稀释至工作浓度，搅拌均匀，无菌定量分装，置 2 ℃~8 ℃保存。

中国兽医协会
CVMA

附　录　C
（规范性）
相关试剂的配制

C.1　包被缓冲液

称取碳酸钠 1.59 g、碳酸氢钠 2.93 g，加双蒸水 800 mL，搅拌溶解，再加双蒸水定容至 1000 mL，pH 值应为 9.4~9.6，2 ℃~8 ℃保存。

C.2　PBS

磷酸氢二钠 2.9 g、磷酸二氢钾 0.2 g、氯化钠 8 g、氯化钾 0.2 g，加入 1000 mL 双蒸水搅拌溶解，pH 值应为 7.2~7.6，2 ℃~8 ℃保存。

C.3　封闭液

量取出 800 mL 的 PBS，称取酪蛋白 10 g、蔗糖 50 g、500 μL PROCLIN-300、0.5 mL 吐温-20 加入其中，搅拌溶解，再加 PBS 定容至 1000 mL，2 ℃~8 ℃保存。

C.4　酶结合物稀释液

量取出 800mL 的 PBS 溶液，加入牛血清白蛋白 10 g，PROCLIN-300 500 μL、吐温-20 1 mL，而后加入 PBS 定容至 1000 mL，再加入 0.1 ‰的胭脂红色素，过滤除菌，2 ℃~8 ℃保存。

C.5 校准品稀释液

量取出 800mL 的 PBS 溶液，加入牛血清白蛋白 10 g，PROCLIN-300 500 μL、吐温-20 1 mL，而后加入 PBS 定容至 1000 mL，过滤除菌，2 ℃~8 ℃保存。

C.6　校准品 1

用校准品稀释液将标准阴性血清按 1∶20 比例进行稀释，将抗体剂量值赋值为 0 NCU/mL，无菌定量分装，2 ℃~8 ℃保存。

C.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分别稀释为 10 NCU/mL、20 NCU/mL、40 NCU/mL、100 NCU/mL 和 200 NCU/mL，分别无菌定量分装，2 ℃~8 ℃保存。

C.8　25 倍浓缩洗涤液

称取磷酸氢二钠（含 12 个结晶水）60 g、磷酸二氢钾 4 g、氯化钠 160 g、氯化钾 4 g，加入 800 mL 双蒸水搅拌溶解，再加入 400 μL PROCLIN-300、10 mL 的吐温-20，而后加双蒸水定容至 1000 mL。

C.9　化学发光底物 A

称取 24.23 g 三羟甲基氨基甲烷溶于 800 mL 纯水中，充分搅拌均匀，用 HCl 调节 pH 值至 8.0。加入 0.026 g 鲁米诺干粉，待其完全溶解后，加入 0.086 g 羟基香豆素，而后加双蒸水定容至 1000 mL，2 ℃~8 ℃保存。

C.10　化学发光底物 B

称取 15.42 g 醋酸铵溶于 800 mL 纯水中，使用冰醋酸调 pH 值至 5.2，加入 0.021 g 维生素 C，待其

完全溶解后，加入 0.066 g 氨基酸氧化酶，而后加纯化水定容至 1000 mL，2 ℃~8 ℃保存。

中国兽医协会
CVMA