ICS 11.220
B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA 32-2020

禽白血病病毒抗原化学发光免疫分析检测方法

chemiluminescent immunoassay for detection of avian leukusis virus antigen

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、新疆生产建设兵团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、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、新疆维吾尔自治区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、广西壮族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。

本文件主要起草人：孙雨、王传彬、顾小雪、马英、赵晓春、肖颖、李秀梅、宋晓晖、刘亚涛、张旭、蒋菲、王睿男、杨林、孙航、姚强、央珍、刘近、杨晓帆、王文、林汉亮、邹联斌、甘平、毕一鸣、魏巍、张力、殷涛、刘颖昳、徐琦、胡冬梅、韦正吉、刘明瑞、耿玉静、任雪建、吴彬、吕园园。

中国兽医协会
CVMA

禽白血病病毒抗原化学发光免疫分析检测方法

1 范围

本文件规定了禽白血病病毒抗原化学发光检测试剂盒检测禽白血病病毒抗原的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。

本文件适用于禽类泄殖腔拭子、蛋清、胎粪样品中禽白血病病毒抗原的检测。

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 禽白血病病毒 p27 蛋白单克隆抗体，按照附录 A 制备

4.2 禽白血病病毒 p27 蛋白酶标单克隆抗体，按照附录 B 制备

4.3 PBST（pH 值 7.2），按照附录 C.1 配制

4.4 包被缓冲液，按照附录 C.2 配制

4.5 封闭液，按照附录 C.3 配制

4.6 酶结合物稀释液，按照附录 C.4 配制

4.7 阴性对照，按照附录 C.5 配制

4.8 阳性对照，按照附录 C.6 配制

4.9 化学发光底物 A，按照附录 C.7 配制

4.10 化学发光底物 B，按照附录 C.8 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

采用双抗体夹心反应原理，包被板上包被禽白血病病毒2E5株单克隆抗体，待检样品中的待检抗原和酶标记抗体形成固相抗体-抗原-酶标抗体免疫复合物，洗涤除去未结合酶标抗体，加底物显色来判定样品中的抗原含量。

7 试验前准备工作

7.1 样本采集及处理

7.1.1 蛋清样品

取全蛋，破碎后取蛋清，置－18 ℃以下冻融1次，用塑料吸头吸取蛋清直接进行检测。

7.1.2 泄殖腔拭子

用棉签于待检鸡只泄殖腔取样后，放入1mL样品稀释液中，置－18 ℃以下冻融1次，恢复室温后，剧烈振荡1 min，挤出棉签中的液体，弃棉签。将液体于2 ℃~8 ℃下，以12000 r/min离心1 min，取上清直接进行检测。

7.1.3 胎粪样品

用棉签取待检鸡只胎粪，放入1 mL样品稀释液中，置－18 ℃以下冻融1次，恢复室温后，剧烈震荡1 min，挤出棉签中的液体，弃棉签。液体在2 ℃~8 ℃下，以12000 r/min离心1 min，取上清直接进行检测。

7.2 样本的保存与运输

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

根据生产工艺的研究结果，用包被缓冲液将2E5株单抗稀释至终浓度为0.85 μg/mL制备包被液，将包被液以100 μL/孔加入发光板，置冰箱2 ℃~8 ℃包被22 h~24 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，置冰箱2 ℃~8 ℃封闭22 h~24 h。

8.4 干燥

弃去封闭液，在吸水纸上拍干。置35 ℃~37 ℃干燥2 h~3 h，加入干燥剂，密封包装，置2 ℃~8 ℃保存。

中国兽医协会 CVMA

8.5 加样

取出CLIA包被板（根据待检样品的多少，可将板条拆开分次使用），分别加入100 μL阴性、阳性对照，每次检测各加两孔；在相应的样品孔中加入100 μL样品。

8.6 温育

贴上封板膜，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 加酶结合物

每孔加入100 μL酶结合物。

8.9 温育

贴上封板膜，置37 ℃恒温培养箱中孵育29 min~31 min。

8.10 重复步骤 7.7

8.11 加入底物

每孔各加入50 μL的化学发光底物A和50μL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）。

8.12 静置

在15 ℃~25 ℃条件下避光静置5 min。

8.13 读值

静置后15min内用化学发光仪读取发光值。

9 结果判定

9.1 成立条件

阴性对照平均值（NC $\overline{X}$ ）　　NC $\overline{X}$ =(NC1+NC2)/2

阳性对照平均值（PC $\overline{X}$ ）　　PC $\overline{X}$ =(PC1+PC2)/2

试验成立判断标准：PC $\overline{X}$ > 10 NC $\overline{X}$ ；否则，试验不成立。

9.2 结果判定描述

S/P=样品/PC ，其中S代表样本发光值。

若S/P≥0.2，样品应判定为阳性；

若S/P＜0.2，样品应判定为阴性。

中国兽医协会 CVMA

附　录　A
（规范性）
禽白血病病毒 p27 蛋白单克隆抗体的制备

A.1　生产用细胞繁殖

从液氮中取出杂交瘤细胞 2E5 株和 3D5 株工作细胞，在 37℃水浴中迅速解冻，用含 20 %胎牛血清的 RPMI-1640 培养液制成细胞悬液，置 37 ℃、含 5 % CO_2 培养箱中培养 48 h～72 h，使其稳定分裂繁殖，长成细胞单层。取长成良好单层的细胞 1 瓶，弃掉培养基，用 10 mL 含 20%胎牛血清的 RPMI-1640 培养液吹悬细胞，按照 1∶3 的比例接种到新的细胞瓶（75 cm^2）中，然后补充含 20 %胎牛血清的 RPMI-1640 培养液至 15 mL/瓶，置 37 ℃、含 5 % CO_2 的培养箱中继续培养 48 h~72 h。

A.2　腹水的制备

将扩大培养的杂交瘤细胞以 1000r/min 离心 10 min，弃上清，用 RPMI-1640 培养基重悬，细胞计数板进行细胞计数，用 RPMI-1640 培养基将细胞浓度稀释至 1.25×10^7 个/mL。取 BALB/c 小鼠，各经腹腔接种杂交瘤细胞，100 μL/只，观察 10 d~15 d，待小鼠腹部明显肿大后，采集腹水。

A.3　腹水的纯化

采用辛酸-饱和硫酸铵沉淀方法，对制备的腹水进行纯化，纯化后的单克隆抗体无菌定量分装，-80 ℃以下保存备用。

中国兽医协会 CVMA

附　录　B
（规范性）
禽白血病 p27 蛋白酶标单克隆抗体的制备

称取 2 mg HRP 溶解于 0.5 mL 蒸馏水中。于上液中加入 0.5 mL 新配的 0.06 M $NaIO_4$ 溶液，4 ℃避光 30 min。上液中加入 160 mM 的乙二醇 0.5 mL，室温放置 30 min。上液中加入 IgG 2 mg，混匀。将上述溶液装入透析袋中，置 2000 mL 的 0.05 mM CB Buffer 中透析，4 ℃搅拌过夜。（0.05 M CB Buffer：Na_2CO_3 3.18 g ＋$NaHCO_3$ 5.88 g，加至 2 L 蒸馏水）透析液吸至 15mL 的离心管中，加 0.2 mL 新配制的 5 mg/mL $NaBH_4$ 液，混匀，再置 4 ℃ 2 h。加入等量的饱和硫酸铵溶液，4 ℃放置 30 min，4 ℃离心 4000 rpm 20 min。弃上清，沥干。将沉淀溶于少量 PBS 中（0.02 M，pH 7.4），装入透析袋中，对 0.02 M pH 7.4 PBS 透析，4 ℃过夜（中途换 PBS 一次）。将透析液中液体吸至 EP 管中，离心，将上清液吸出，加等量甘油，混匀。-20 ℃保存即可。

中国兽医协会 CVMA

附　录　C
（规范性）
相关试剂的配制

C.1　PBST（pH 值 7.2）

称取 2.9 g 磷酸氢二钠（含 12 个结晶水），0.2 g 磷酸二氢钾，8.0 g 氯化钠，0.2 g 氯化钾，溶于 800 mL 纯化水，再加入 0.5 mL 吐温 20，用 HCl 调节 pH 值至 7.2，纯化水定容至 1 L。

C.2　包被缓冲液

称取 2.93 g 碳酸氢钠，1.59 g 碳酸钠，溶解于 1 L 纯化水中。

C.3　封闭液

称取 15 g 酪蛋白，加入 1 L PBST，充分搅拌至完全溶解，置 2 ℃~8 ℃保存。

C.4　酶结合物稀释液

称取 6.06 g Tris，8.2 g 氯化钠，15 g 酪蛋白，1.5 g 氨基比林，加入 800 mL 纯化水，待充分溶解加入终浓度为 0.02 %的 Proclin-300，0.1 g 胭脂红色素，加纯化水定容至 1 L。

C.5　阴性对照

用稀释液将制备的阴性标准品按 1∶20 稀释，无菌定量分装，置 2 ℃~8 ℃保存。

C.6　阳性对照

用稀释液将制备的阳性标准品按 1∶20 稀释，无菌定量分装，置 2 ℃~8 ℃保存。

C.7　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，而后加纯化水定容至 1000 mL，2 ℃~8 ℃保存。

C.8　化学发光底物 B

称取 15.42 g 醋酸铵溶于 800 mL 纯水中，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