ICS 11.220
B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA 31-2020

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

2019-12-22 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、青海省动物疫病预防控制中心、江西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、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、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、广西壮族自治区动物疫病预防控制中心。

本文件主要起草人：孙雨、王传彬、蔡金山、毕一鸣、赵晓春、李秀梅、肖颖、宋晓晖、刘亚涛、杨林、王睿男、孙航、马英、姚强、魏巍、李晓霞、王谢忠、阚威、王文、曹丽萍、顾小雪、林汉亮、蒋菲、康文彪、邹联斌、黄辉、韦正吉、刘颖昳、任雪建、刘近、李硕、徐琦、胡冬梅、 原小燕、吕园园、耿玉静。

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

本文件规定了口蹄疫病毒 O 型抗体的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、牛、羊等动物血清中口蹄疫病毒 O 型抗体的检测。

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 口蹄疫 VP1 重组蛋白，按照附录 A 制备

4.2 口蹄疫 O 型酶标单克隆抗体，按照附录 B 制备。

4.3 酶结合物，按照附录 B 制备

4.4 PBS 缓冲液，按照附录 C.1 配制

4.5 包被缓冲液，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 样品稀释液，按照附录 C.5 配制

4.9 校准品稀释液，按照附录 C.6 配制

4.10 校准品 1~校准品 6，按照附录 C.7~C.8 配制

4.11 25 倍浓缩洗涤液，按照附录 C.9 配制

4.12 化学发光底物 A，按照附录 C.10 配制

4.13 化学发光底物 B，按照附录 C.11 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

本方法采用竞争原理，将口蹄疫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，回算出口蹄疫病毒O型抗体计量值，从而反应出猪血清中口蹄疫病毒O型抗体含量，判断阴阳性结果。因此，待检血清中口蹄疫病毒O型抗体的浓度与发光值成反比。

7 试验前准备工作

7.1 样本采集及保存处理

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2 mL。倾斜放置于室温中静置2 h~4 h，待血液自然析出血清，必要时可低速离心（1000 r离心10 min~15 min ），分离血清。采集的血清样本低温保存、运输。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为1 μg/mL，以100 μL/孔的量加入发光板中，置冰箱2 ℃~8 ℃包被16 h~24 h。

8.2 洗板

弃去包被液，将25倍浓缩洗涤液稀释成1倍洗涤液，用300 μL洗涤液洗涤板孔，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2 ℃~8 ℃封闭16 h~24 h。弃去封闭液，在吸水纸上拍干。

8.4 干燥

置于室温干燥 20 h~24 h 后，将包被板装入铝箔袋，加干燥剂，抽真空，置于 2 ℃~8 ℃保存备用。

8.5 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：3 μL样品加57 μL样品稀释液。

8.6 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 60 μL，其余各孔依次加入待检样品各 60 μL，再向以上各孔均加入 60 μL 酶结合物，震荡混匀；每孔吸取 100 μL 转移至包被板对应孔内。

8.7 温育

置37℃恒温培养箱中温育29 min~31 min。

8.8 洗板

将各孔的液体弃入废液筒，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。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。

8.9 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）。

8.10 静置

在15 ℃~25 ℃条件下避光静置5 min。

8.11 读值

静置后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、50 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，即可得出样品中口蹄疫病毒O型抗体剂量值。

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，试验不成立。

11 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病毒O型抗体的剂量值。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）
口蹄疫 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+（100μg/mL）LB 液体培养基中，置 37 ℃培养至 OD600nm 值为 0.65。

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，在 37 ℃条件下，220 rpm/min 继续诱导 6 h，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 min 收集菌体，弃上清，收集菌体。收集菌体后每 100 mg 菌体湿重加入 1 mL~5 mL 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 VP1 重组蛋白。

中国兽医协会
CVMA

附　录　B
（规范性）
口蹄疫 0 型酶标单克隆抗体的制备及纯化（酶结合物的制备）

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 % CO_2 培养箱中培养，48 h~72 h，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 周龄～16 周龄 SPF 级雄性 Balb/c 小鼠，按 0.5 mL/只腹腔注射弗氏不完全佐剂，7 d~10 d 后每只小鼠腹腔接种 1×10^6 个~5×10^6 个 4C5C8 株杂交瘤细胞，经 7 d~10 d 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 8000 r/min 离心 10 min，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 2 mg HRP 溶解于 0.5mL 蒸馏水中，加入 0.5 mL 新配的 0.06 M $NaIO_4$ 溶液，4 ℃避光 30 min。加入 160 mM 的乙二醇 0.5 mL，室温放置 30 min。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，4 ℃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 $NaBH_4$ 液，混匀，4 ℃放置 12 h。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 口蹄疫 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，12 mL/瓶，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　PBS 缓冲液

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

C.2　包被缓冲液

称取 Na_2CO_3 1.59 g、$NaHCO_3$ 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。

C.3　封闭液

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

C.4　酶结合物稀释液

取 PBS 800 mL，加入牛血清白蛋白 10 g，ProcLin-300 500 μL、吐温-20 1 mL，而后加入纯化水定容至 1000 mL，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 2.9 g、磷酸二氢钾 0.2 g、氯化钠 8 g、氯化钾 0.2 g，加入 800 mL 纯化水搅拌溶解，再称取 BSA 10 g 加入，量取 ProcLin-300 500 μL、吐温-20 1 mL 加入，而后加纯化水定容至 1000 mL，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 PBS 800 mL，加入 800 mL 纯化水搅拌溶解，再加入 BSA 10 g，ProcLin-300 500 μL、吐温-20 1 mL，而后加纯化水定容至 1000 mL，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 0 NCU/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 10 NCU/mL、20 NCU/mL、50 NCU/mL、100 NCU/mL、200 NCU/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 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 μLProcLin-300、10 mL 的吐温-20，而后加纯化水定容至 1000 mL，2 ℃~8 ℃保存。

C.10 化学发光底物 A

称取 24.23 g Tris（三羟甲基氨基甲烷）溶于 800 mL 纯水中，充分搅拌均匀，使用盐酸调节 PH 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.11 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