ICS 11.220
B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA 30-2020

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

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、青海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、洛阳现代生物技术研究院有限公司、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、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、马英、宋晓晖、赵晓春、王睿男、李秀梅、杨林、蔡金山、刘亚涛、阚威、黄辉、姚强、王谢忠、孙航、顾小雪、林汉亮、王文、沈艳丽、赵全邦、央珍、蒋菲、邹联斌、韦正吉、毕一鸣、刘颖昳、徐琦、胡冬梅、刘近、吕园园、耿玉静、任雪建。

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

本文件规定了口蹄疫病毒 A 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 A 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 A 型单克隆抗体，按照附录 B 制备

4.3 酶结合物，按照附录 C 制备

4.4 包被缓冲液，按照附录 D.1 配制

4.5 封闭液，按照附录 D.2 配制

4.6 酶结合物稀释液，按照附录 D.3 配制

4.7 样品稀释液，按照附录 D.4 配制

4.8 校准品稀释液，按照附录 D.5 配制

4.9 校准品 1~校准品 6，按照附录 D.6~D.7 配制

4.10 25 倍浓缩洗涤液，按照附录 D.8 配制

4.11 化学发光底物 A，按照附录 D.9 配制

4.12 化学发光底物 B，按照附录 D.10 配制

5 仪器与设备

中国兽医协会 CVMA

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，包被板上包被口蹄疫VP1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 实验前准备工作

7.1 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 g离心10 min~15 min ），分离血清，应符合NY/T 541的要求。

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。

8 操作步骤

8.1 包被

将VP1重组蛋白用包被缓冲液稀释到1.5 μg/mL，以100 μL/孔的量加入酶标板中，置2 ℃~8 ℃包被16 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~5 h。将包被板装入铝箔袋，加干燥剂，抽真空，置于冰箱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。

中国兽医协会 CVMA

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、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，即可得出样品中口蹄疫病毒A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A型抗体的剂量值。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）
重组蛋白的制备

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 比例转接含卡那霉素（100 μg/mL）LB 液体培养基中，置 37 ℃培养至 OD600nm 值约为 0.65。

A.1.2　重组蛋白的诱导表达

将生产用菌液加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG，在 37 ℃条件下，220 rpm/min 继续诱导 6 h，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 10000 r/min 离心 3 min 收集菌体，菌体沉淀用适量的超声破菌缓冲液（20 mmol/L Tris- HCl pH 8.0、0.5 mol/L 氯化钠、1 mMol/L EDTA、1 mg/mL 溶菌酶）重悬，超声破碎，功率为 300 W，破碎 15 s，间隔 15 s，每个循环 30 s，总时间 20 min。破碎后的匀浆在 2 ℃~8 ℃条件下、以 12000 r/min 离心 10 min，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）
口蹄疫 A 型单克隆抗体的制备

B.1　杂交瘤细胞繁殖

从种子库取出生产用细胞株 5E12D5，进行细胞复苏。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 $l\times10^6$ 个~5×10^6 个 5E12D5 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，－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）
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 5 mg HRP 溶解于 1 mL 蒸馏水中。

C.1.2 于上述溶液中加入 0.2 mL 新配制的 0.1 mol/L $NaIO_4$ 溶液，室温下避光搅拌 20 min。

C.1.3 将上述溶液装入透析袋中，使用 1 mMol/L 的醋酸钠缓冲液（pH 4.4）透析，2 ℃~8 ℃过夜。

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

C.1.5 加新配的 $NaBH_4$ 溶液（4 mg/mL）0.06 mL，混匀，置 2 ℃~8 ℃ 2 h。

C.1.6 将上述溶液装入透析袋中，PBS 缓冲液（0.01 mol/L ，pH 7.2）透析，2 ℃~8 ℃过夜。

C.1.7 称取 100 g 硫酸铵，加入 90 mL 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 h。

C.1.8 以 8000 r/min 离心 30 min，弃上清液。沉淀物用 1 mL PBS 缓冲液（0.01 mol/L，pH 值 7.2）溶解，最后边摇晃边逐滴加入 0.5 mL 饱和硫酸铵，使其终浓度达到 33%，置 2 ℃~8 ℃静置 3 h，以 8000 r/min 离心 30 min，弃上清，沉淀用 1 mL PBS（0.01 mol/L，pH 值 7.2）溶解。将上述溶液装入透析袋中，用 PBS 缓冲液（0.01 mol/L，pH 值 7.2）透析，去除铵离子后（用萘氏试剂检测），以 8000 r/min 离心 30 min 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

将制备的口蹄疫 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，5 mL/瓶，置 2 ℃~8 ℃保存。

中国兽医协会 CVMA

附　录　D
（规范性）
相关试剂的配制

D.1　包被缓冲液

50 mM 碳酸盐缓冲液（15 mM Na_2CO_3，34.9 mM $NaHCO_3$，pH 9.6），放置 4 ℃备用，保存期一周。

D.2　封闭液

10 mM 三羟基氨基甲烷、26.4 mM 海藻糖、0.1 %（m/v）酪蛋白、146 mM 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

16.2 mM 十二水磷酸氢二钠、2.9 mM 磷酸二氢钾、137 mM 氯化钠、2.7 mM 氯化钾，搅拌溶解，加入 0.1 % （m/v）酪蛋白，6.48 mM 氨基比林，0.91 mM 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）2.9 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 15 g 加入，量取 ProcLin- 300 1 mL、吐温-20 1 mL 加入，而后加纯化水定容至 1000 mL，过滤除菌，无菌定量分装，2℃~8℃保存。

D.5　校准品稀释液

取 PBS 800 mL，加入牛血清白蛋白 10 g，ProcLin-300 1 mL、吐温-20 1 mL，而后加入 PBS 定容至 1000 mL，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 0 NCU/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 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。

D.8　25 倍浓缩洗涤液

称取磷酸氢二钠（含 12 个结晶水）72.5 g、磷酸二氢钾 5 g、氯化钠 200 g、氯化钾 5 g ，加入 800 mL 纯化水搅拌溶解，再加入 ProcLin-300 1 mL、吐温-20 25 mL，而后加纯化水定容至 1000 mL，定量分装，2 ℃~8 ℃保存。

D.9 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。

D.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