ICS 11.220
B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA 33-2020

小反刍兽疫病毒抗体化学发光免疫分析检测方法

chemiluminescent immunoassay for detection of peste des petits ruminants virus antibody

2020-12-22 发布　　2020-12-22 实施

中 国 兽 医 协 会　发 布

中国兽医协会 CVMA

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、中国农业科学院兰州兽医研究所、洛阳现代生物技术研究院有限公司、青海省动物疫病预防控制中心、新疆维吾尔自治区动物疾病预防控制中心、新疆生产建设兵团省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、甘肃省永昌县肉用种羊繁育技术推广站。

本文件主要起草人：孙雨、才学鹏、宋晓晖、王传彬、李秀梅、满永恒、蔡金山、阚威、窦永喜、陈少渠、王睿男、肖颖、赵晓春、杨林、张旭、孙航、刘亚涛、王文、胡广卫、马英、毕一鸣、黄辉、姚强、甘平、张力、殷涛、刘颖昳、刘近、蒋菲、邹联斌、韦正吉、吕园园、林汉亮、李硕、徐琦、胡冬梅、原小燕、任雪建、刘明瑞、赵津子。

中国兽医协会
CVMA

小反刍兽疫病毒抗体化学发光免疫分析检测方法

1 范围

本文件规定了小反刍兽疫病毒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。

本文件适用于动物血清中小反刍兽疫病毒抗体的检测。

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 小反刍兽疫病毒重组蛋白 N 抗原，按照附录 A 制备

4.2 小反刍兽疫病毒单克隆抗体，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 封闭液，按照附录 C.2 配制

4.6 酶结合物稀释液，按照附录 C.3 配制

4.7 校准品稀释液，按照附录 C.4 配制

4.8 校准品 1～校准品 6，按照附录 C.5～C.6 配制

4.9 25 倍浓缩洗涤液，按照附录 C.7 配制

4.10 化学发光底物 A，按照附录 C.8 配制

4.11 化学发光底物 B，按照附录 C.9 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，包被板上包被重组蛋白 N 抗原，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 样品采集及处理

采集静脉血时，每头羊使用一个注射器。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

使用包被缓冲液将小反刍兽疫病毒重组N蛋白稀释。每孔加100 μL。置于冰箱4 ℃包被16 h~24 h。

8.2 洗板

弃去包被液，用300 μLPBST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4 ℃封闭16 h~24 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。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 30 μL，其余各孔依次加入待检样品各 30 μL，再向以上各孔均加入 60 μL 酶结合物，震荡混匀；每孔吸取 75 μL 转移至包被板对应孔内。

8.6 温育

置37 ℃恒温培养箱中温育29 min~31 min。

8.7 温育后洗板

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）。

8.9 静置

在15 ℃~25 ℃条件下避光静置5 min。

8.10 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，即可得出样品中小反刍兽疫抗体的含量。

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，试验不成立。

11 结果判定

如果待测样品中抗体含量＜临界值40 NCU/mL，样品应判定为小反刍兽疫病毒抗体阴性；如果样品中抗体含量≥临界值40 NCU/mL，则判定为小反刍兽疫病毒抗体阳性。

中国兽医协会 CVMA

附　录　A
（规范性）
小反刍兽疫病毒重组蛋白 N 抗原的制备

A.1 生产用菌液繁殖

将生产用菌种种子按 1:100 比例转接含卡那霉素(100 μg/mL)的 LB 液体培养基中，置 37 ℃培养至 OD600 nm 值为 0.6。

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 0.75 mmol/mL，16 ℃下继续诱导 12 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 2 ℃~8 ℃条件下、以 8000 r/min 离心 10 min，弃上清，收集菌体沉淀，用 PBS（0.01 mol/L，pH 值 7.4）洗菌体沉淀三次，以 8000 r/min 离心 10 min，用适量 PBS（0.01mol/L，pH 值 7.4）重悬菌体沉淀，在 150 W 功率的超声波的作用下冰浴裂解，有效时间为 10 min，工作时间为 5s，间隔 5s。将超声裂解物在 2 ℃~8 ℃、以 12000 r/min 离心 15 min，保留上清。

将制备的上清穿过预处理过的树脂柱，重复 5 次~7 次，依次用 10 mmol/L 咪唑缓冲液、20 mmol/L 咪唑缓冲液、40 mmol/L 咪唑缓冲液、60 mmol/L 咪唑缓冲液、80 mmol/L 咪唑缓冲液、100 mmol/L 咪唑缓冲液、200 mmol/L 咪唑缓冲液及 500 mmol/L 咪唑缓冲液对重组蛋白进行洗杂和洗脱，收集洗脱液，并洗脱产生的滤液通过 Superdex 200 凝胶柱分子筛进行进一步精细纯化，最后将纯化后的蛋白吸出加到透析袋中（8kd）浸泡在 2 L 的透析液中，过夜透析，-70 ℃保存。

中国兽医协会 CVMA

附　录　B
（规范性）
小反刍兽疫病毒酶标单克隆抗体的制备及纯化

B.1　小反刍兽疫病毒单克隆抗体的制备

B.1.1 杂交瘤细胞繁殖

将生产用小反刍单抗细胞株用含有 15 %胎牛血清的高糖型 DMEM 培养液（pH 值 7.0）制成细胞悬液，置 5 % CO_2 培养箱中培养，48 h~72 h，细胞能稳定分裂繁殖，长成单层。

B.1.2 小鼠腹水制备

采用体内诱生法制备单克隆抗体，选取 12 周龄~16 周龄健康雄性 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 个杂交瘤细胞，经 7 d~10 d 后可见小鼠腹腔明显膨大，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 ℃以下冻存备用。

B.1.3 单克隆抗体的纯化

采用辛酸-饱和硫酸铵沉淀方法，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，－70 ℃以下冻存备用。

B.2　单克隆抗体的 HRP 标记

称取 2 mgHRP 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，4 ℃避光 30 min。加入 160 mmol/L 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 中透析，4 ℃搅拌过夜。透析液吸至 15 mL 的离心管中，加 0.2 mL 新配制的 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.3　酶结合物的制备

将 HRP 标记好的单克隆抗体进行无菌定量分装，5 mL/瓶-70 ℃以下保存。

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

准确称取 1.59 g 碳酸钠、2.93 g 碳酸氢钠，量取 1000 mL 纯化水，使用搅拌器搅拌使其完全溶解，使用酸度计测定 pH 值（要求 pH 9.6~9.8）。

C.2　封闭液

称取 2.9 g 磷酸氢二钠、0.2 g 磷酸二氢钾、8 g 氯化钠、0.2 g 氯化钾，量取 1000 mL 纯化水，搅拌溶解，使用酸度计测定 pH 值（要求 pH 值 7.2~7.4），再称取牛血清白蛋白 20 g，蔗糖 50 g，加入其中，搅拌溶解后，再加入 0.5 mL ProClin-300，0.5 mL 吐温-20，搅拌混匀。

C.3　酶结合物稀释液

加入 2.9 g 磷酸氢二钠、0.2 g 磷酸二氢钾、8 g 氯化钠、0.2 g 氯化钾，量取 1000 mL 纯化水，搅拌溶解，使用酸度计测定 pH 值（要求 pH 值 7.2~7.4），再称取牛血清白蛋白 10 g 加入其中，搅拌溶解后，再加入 0.5 mL ProClin-300，0.5 mL 吐温 20，搅拌混匀。

C.4 校准品稀释液

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 PBS 容至 1000 mL，过滤除菌，2 ℃~8 ℃保存。

C.5　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.6　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。

C.7 25 倍浓缩洗涤液

称取 Na_2HPO_4•$12H_2O$ 72.5 g、KH_2PO_4 5 g、NaCl 200 g、KCl 5 g，加入 700 mL 双蒸水加热搅拌溶解，再加入 12.5 mL 的吐温 20，而后加双蒸水定容至 1000mL。使用前将 25 倍浓缩洗涤液用蒸馏水或去离子水 25 倍稀释。1 份 25 倍浓缩洗涤液加 24 份蒸馏水。例如：40 mL 25 倍浓缩洗涤液加入 960 mL 蒸馏水。

C.8　化学发光底物 A

称取 24.23 g Tris 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 0.026g 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.9　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，置 2 ℃~8 ℃条件下保存。

中国兽医协会
CVMA