ICS 11.220
B 41

T/CVDA

团体标准

T/CVDA 4—2022

动物中东呼吸综合征冠状病毒中和抗体检测技术

Detecting technique of neutralization antibody against MERS-CoV in animals

2022－07－19 发布　　2022－07－25 实施

中国兽药协会　发布

目 次

前言 II
1 范围 1
2 规范性引用文件 1
3 缩略语 1
4 试剂和材料 1
5 器材和设备 2
5.1 器材 2
5.2 设备 2
6.动物血清 2
6.1 样品采集 2
6.2 样品制备 2
6.3 样品处理 2
7 VNT 试验操作 2
7.1 安全防护 2
7.2 材料准备 3
7.3 检测操作 3
8 结果观察与判定 4
8.1 染色结果观察 4
8.2 结果判定 4

前　言

本标准按照GB/T 1.1-2020给出的规则起草。

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。

本标准由中国兽药协会提出并归口管理，由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所起草。

本标准主要起草单位：中国农业科学院哈尔滨兽医研究所、宁夏大学、中牧实业股份有限公司。

本标准主要起草人：步志高，刘任强，温志远，山丹，龚振兴，张蕾，华荣虹，葛金英，王喜军，王翀。

本标准为首次发布。

动物中东呼吸综合征冠状病毒中和抗体检测技术

1 范围

本标准规定了用于动物东呼吸综合征病毒血清中和抗体定量测定的病毒中和试验（VNT）的实验操作方法及结果判定标准。

本标准适用于动物血清中中东呼吸综合征冠状病毒中和抗体的定性检测和定量测定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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。

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。

GB/T6682—2008 分析实验室用水规格和试验方法。

GB19489—2008 实验室生物安全通用要求。

GB14922-94：实验动物微生物学和寄生虫学检测等级（啮齿类和兔类）。

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

MERS：中东呼吸综合征（Middle East respiratory syndrome）；

VNT：病毒中和试验（viral neutralization test）；

BSL-2：生物安全2级实验室（Biosafety Laboratory Level2）；

DMEM：细胞基础培养基（Dulbecco’s Eagle’ s Minimum Essential Medium）；

PBS：磷酸盐缓冲液（Phosphate-Buffered Saline）；

$TCID_{50}$：半数组织培养感染量（Median Tissue Culture Infective Dose）；

VSV：水泡性口炎病毒（Vesicular Stomatitis Virus）；

eGFP：增强绿色荧光蛋白（enhanced green fluorescent protein）；

S protein：纤突蛋白（spike protein）。

4 试剂和材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

4.1 水：GB/T6682-2008，ddH_2O。

4.2 中东呼吸综合征冠状病毒抗体阴性血清，为利用ELISA和RT-PCR方法验证均为阴性的骆驼阴性血清（由标制单位提供）。

4.3 中东呼吸综合征冠状病毒抗体阳性血清，为rLa-MERSs重组新城疫病毒两次免疫骆驼2w后收集的阳性血清（由标制单位提供）。

4.4 稀释用DMEM（见 A.1）。

4.5 细胞培养用DMEM（见 A.2）。

4.6 细胞培养用抗生素溶液（见 A.3）。

4.7 Vero E6细胞（由标制单位提供）。

4.8 重组水泡性口炎病毒毒株VSVΔG-MERSs-eGFP（由标制单位提供）：以水泡性口炎病毒Indiana毒株为载体，缺失自身G蛋白，同时表达中东呼吸综合征病毒S蛋白和eGFP，滴度应≥$10^{5.0}$ $TCID_{50}$/mL。

5 器材和设备

5.1 器材

5.1.1 8 道移液器 50 μL~200 μL（±2%）。
5.1.2 细胞培养板：96 孔微量平底培养板。
5.1.3 细胞计数器。
5.1.4 U 型底 96 孔板。
5.1.5 细胞培养瓶离心管（1.5 mL，15 mL，50 mL）；吸头（20 μL~200 μL）。

5.2 设备

5.2.1 恒温培养箱：37 ℃ 5%二氧化碳培养箱。
5.2.2 显微镜：倒置荧光显微镜。
5.2.3 冰箱：普通冰箱和超低温冰箱。
5.2.4 BSL-2 级生物安全柜。
5.2.5 离心机。
5.2.6 恒温水浴箱。

6. 动物血清

6.1 样品采集

动物血清采集时应做好个人防护（带 N95 口罩、手套，穿生物安全防护服），配备含 75%酒精、碘伏、止血绷带的应急处理箱。

6.2 样品制备

无菌静脉采集动物血液不少于 2 mL，37 ℃静置 60min。4 ℃放置 1h 至过夜后，6000 r/min 离心 5 min，收集上清，-20 ℃以下保存待检。样品采集应详细记录相关信息。

6.3 样品处理

采集和制备血清中的废弃物应置于生物安全垃圾袋内，集中高压处理。

7 VNT 试验操作

7.1 安全防护

本检测应在满足 GB19489-2008 的 BSL-2 级生物安全实验室内进行。进行本检测的人员应采取针对

性防护措施（佩戴口罩、手套、着长袖工作服）。废弃病毒液应弃于 0.1%氢氧化钠溶液中。

7.2 材料准备

7.2.1 细胞

Vero E6 细胞按照常规方法，用含 10%胎牛血清的 DMEM 液培养基在 37 ℃ 5%二氧化碳培养箱中培养。1 个 75 cm^2 的细胞培养瓶（15 mL 培养液）细胞刚长成单层后（4×10^6 个 /mL），可用于 4 块 96 孔（细胞数为 1×10^4 个/孔）细胞培养板的检测。

7.2.2 检测用培养板

以 96 孔细胞培养板进行检测。提前 16~24 h 将 Vero E6 细胞铺在 96 孔板中，长成单层备用。

7.2.3 血清灭活

SPF 级小鼠免疫中东呼吸综合征冠状病毒 S 蛋白，三次免疫后无菌采血，制备阳性血清。未免疫 SPF 级小鼠，无菌采血，制备阴性血清。待测血清、阳性血清、阴性血清在 56 ℃下灭活 30min。灭活时，将血清样本放在 56 ℃ 恒温水浴箱内，水面要高于血清液面，但不要超过试管高度。

7.3 检测操作

7.3.1 血清的稀释

7.3.1.1 在培养板上分别标记清楚待检血清、阳性血清、阴性血清对应样品编号，每个样品的同一个稀释度设 4 个重复，稀释直接在 U 型底 96 孔培养板中进行。

7.3.1.2 在 U 型底 96 孔板中加入 50 μL 稀释用 DMEM。第一行中加入 50 μL 血清样品，每个样品共设 4 个重复。

7.3.1.3 用 50 μL 8 道移液器对血清样品进行连续的 2 倍稀释，每个稀释度共设 4 个重复。产生 1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64、1/128、1/256 的稀释倍数。弃掉从最后一行孔中吸出的 50 μL 液体。

7.3.2 病毒的回归滴定

7.3.2.1 在 U 型底 96 孔板进行病毒回归测定的稀释，第 1~10 每孔中加入 100 μL 稀释用 DMEM，用于病毒滴度的回归测定；在第 11~12 列中加入 150 μL 稀释用 DMEM 用作细胞对照。

7.3.2.2 VSVΔG-MERSs-eGFP 病毒液在-80 ℃及以下温度保存。用时取出 1 份，置于生物安全柜中融化，立即用稀释用 DMEM 将病毒稀释成 200$TCID_{50}$/50 μL，稀释总体积满足每个细胞培养板不少于 5 mL。

7.3.2.3 向病毒回归测定的稀释对照板第 1 列加入 100 μL VSVΔG-MERSs-eGFP 病毒（400 $TCID_{50}$）。

7.3.2.4 病毒和培养基混匀后，从第 1 列吸取 100 μL 加入到第 2 列，如此连续稀释至第 10 列。每稀释一次要更换一次吸头。

7.3.2.5 弃去第 10 列稀释的 VSVΔG-MERSs-eGFP 病毒液 50 μL，弃于 0.1%氢氧化钠溶液中。

7.3.2.6 弃去 96 孔细胞培养板中的培养基，将上述稀释好的病毒用 50 μL 8 道移液器从高稀释毒向低稀释度依次加入细胞培养板中，每孔加 50 μL。37℃作用 1h 后再补细胞培养用 DMEM，每孔加 100 μL，从病毒高稀释孔向病毒低稀释孔依次加入。

7.3.3 病毒与血清的中和

7.3.3.1 病毒的加入

待测血清样品测定板内全部各孔均加入 7.3.2.2 稀释的 VSVΔG-MERSs-eGFP 病毒 50 μL（200$TCID_{50}$）。用 8 道移液器加入病毒液，从血清稀释倍数低的孔向血清稀释倍数高的孔的方向依次加入病毒液，并且吸头不应接触液面。加入病毒后以培养板盖盖好。

7.3.3.2 中和

将上述全部培养板从生物安全柜中取出，置 37 ℃温箱中，中和 60~90 min（最多不超过 90 min）。

7.3.4 弃去 96 孔细胞培养板中的培养基，将血清与病毒中和后的样品对应加入 96 孔细胞培养板中，每孔 50 μL。加样时用 8 道移液器加样，从血清稀释倍数低的孔向血清稀释倍数高的孔的方向依次加入血清和病毒的混合样品。

7.3.5. 将细胞培养板放入细胞培养箱中作用 1h 后，每孔补加 100 μL 细胞培养用 DMEM，从血清低稀释孔向血清高稀释孔依次加入。

7.3.6 培养

全部培养板置 37 ℃ 5%二氧化碳培养箱中培养 48 h。

8 结果观察与判定

8.1 染色结果观察

8.1.1 观察顺序

按病毒回归滴定板、血清对照样、待测血清样顺序观察。

8.1.2 观察结果记录

在荧光显微镜下观察荧光情况，观察每孔所有视野，依次记录病毒回归滴定结果、细胞对照、培养基对照、阴性血清对照、阳性血清对照及待测血清结果。

8.2 结果判定

8.2.1 判定成立条件

病毒回归滴定结果的计算值应介于 100~300 $TCID_{50}$/50μL 之间；细胞对照、培养基对照、阴性血清对照、阳性血清对照均成立。

8.2.2 结果判定

当细胞对照、培养基对照、阴性血清对照、阳性血清对照均成立时，方可进行判定，判定时间为培养 48 h。被检血清孔 50%荧光被抑制，判为阳性，如低于 50%判为阴性。血清能够抑制 50%荧光的最高稀释倍数，判定为该血清的中和抗体滴度。当中和抗体滴度≥8 时判为阳性。

附录 A
（规范性附录）
溶液配制

A.1 稀释用 DMEM 培养基

无菌量取 DMEM 培养 990mL，抗生素溶液(见 A. 3) 10mL。4℃ 保存。

A.2 细胞培养用 DMEM 培养基

无菌量取 DMEM 培养基 870 mL，加入胎牛血清 100 mL、100 mM/L L-谷氨酰胺 20 mL、抗生素溶液（见 A.3) 10 mL。4℃ 保存。

A.3 细胞培养用抗生素溶液

以 DMEM 培养基溶解市售抗生素，达到青霉素浓度 100 IU/mL\链霉素浓度 100 mg/mL，分装后 -20℃ 保存。

附录 B
（资料性附录）
中东呼吸综合征冠状病毒纤突蛋白基因序列

B.1　中东呼吸综合征冠状病毒纤突蛋白基因序列

ATGATACACTCAGTGTTTCTACTGATGTTCTTGTTAACACCTACAGAAAGTTACGTTGATGTAG
GGCCAGATTCTGTTAAGTCTGCTTGTATTGAGGTTGATATACAACAGACTTTCTTTGATAAAACTTG
GCCTAGGCCAATTGATGTTTCTAAGGCTGACGGTATTATATACCCTCAAGGCCGTACATATTCTAACA
TAACTATCACTTATCAAGGTCTTTTTCCCTATCAGGGAGACCATGGTGATATGTATGTTTACTCTGCA
GGACATGCTACAGGCACAACTCCACAAAAGTTGTTTGTAGCTAACTATTCTCAGGACGTCAAACA
GTTCGCTAATGGGTTTGTCGTCCGTATAGGAGCAGCTGCCAATTCCACTGGCACTGTTATTATTAGC
CCATCTACCAGCGCTACTATACGAAAAATTTACCCTGCTTTTATGCTGGGTTCTTCAGTTGGTAATTT
CTCAGATGGTAAAATGGGCCGCTTCTTCAATCATACTCTAGTCCTTTTGCCCGATGGATGTGGCACT
TTACTTAGAGCTTTTTATTGTATTCTAGAGCCTCGCTCTGGAAATCATTGTCCTGCTGGCAATTCCTA
TACTTCTTTTGCCACTTATCACACTCCTGCAACAGATTGTTCTGATGGCAATTACAATCGTAATGCC
AGTCTGAACTCTTTTAAGGAGTATTTTAATTTACGTAACTGCACCTTTATGTACACTTATAACATTAC
CGAAGATGAGATTTTAGAGTGGTTTGGCATTACACAAACTGCTCAAGGTGTTCACCTCTTCTCATC
TCGGTATGTTGATTTGTACGGCGGCAATATGTTTCAATTTGCCACCTTGCCTGTTTATGATACTATTA
AGTATTACTCTATCATTCCTCACAGTATTCGTTCTATCCAAAGTGATAGAAAAGCTTGGGCTGCCTTC
TACGTATATAAACTTCAACCGTTAACTTTCCTGTTGGATTTTTCTGTTGATGGTTATATACGCAGAGC
TATAGACTGTGGTTTTAATGATTTGTCACAACTCCACTGCTCATATGAATCCTTCGATGTTGAATCTG
GAGTTTATTCAGTTTCGTCTTTCGAAGCAAAACCTTCTGGCTCAGTTGTGGAACAGGCTGAAGGTG
TTGAATGTGATTTTTCACCTCTTCTGTCTGGCACACCTCCTCAGGTTTATAATTTCAAGCGTTTGGTT
TTTACCAATTGCAATTATAATCTTACCAAATTGCTTTCACTTTTTTCTGTGAATGATTTTACTTGTAGT
CAAATATCTCCAGCAGCAATTGCTAGCAACTGTTATTCTTCACTGATTTTGGATTACTTTTCATACCC
ACTTAGTATGAAATCCGATCTCAGTGTTAGTTCTGCTGGTCCAATATCCCAGTTTAATTATAAACAGT
CCTTTTCTAATCCCACATGTTTGATTTTAGCGACTGTTCCTCATAACCTTACTACTATTACTAAGCCTC
TTAAGTACAGCTATATTAACAAGTGCTCTCGTCTTCTTTCTGATGATCGTACTGAAGTACCTCAGTTA
GTGAACGCTAATCAATACTCACCCTGTGTATCCATTGTCCCATCCACTGTGTGGGAAGACGGTGATT
ATTATAGGAAACAACTATCTCCACTTGAAGGTGGTGGCTGGCTTGTTGCTAGTGGCTCAACTGTTG
CCATGACTGAGCAATTACAGATGGGCTTTGGTATTACAGTTCAATATGGTACAGACACCAATAGTGT
TTGCCCCAAGCTTGAATTTGCTAATGACACAAAAATTGCCTCTCAATTAGGCAATTGCGTGGAATAT
TCCCTCTATGGTGTTTCGGGCCGTGGTGTTTTTCAGAATTGCACAGCTGTAGGTGTTCGACAGCAG
CGCTTTGTTTATGATGCATACCAGAATTTAGTTGGCTATTATTCTGATGATGGCAACTACTACTGTTT
GCGTGCTTGTGTTAGTGTTCCTGTTTCTGTCATCTATGATAAAGAAACTAAAACCCACGCTACTCTA
TTTGGTAGTGTTGCATGTGAACACATTTCTTCTACCATGTCTCAATACTCCCGTTCTACGCGATCAAT
GCTTAAACGGCGAGATTCTACATATGGCCCCCTTCAGACACCTGTTGGTTGTGTCCTAGGACTTGTT
AATTCCTCTTTGTTCGTAGAGGACTGCAAGTTGCCTCTCGGTCAATCTCTCTGTGCTCTTCCTGACA
CACCTAGTACTCTCACACCTCGCAGTGTGCGCTCTGTTCCAGGTGAAATGCGCTTGGCATCCATTG
CTTTTAATCATCCCATTCAGGTTGATCAACTTAATAGTAGTTATTTTAAATTAAGTATACCCACTAATT
TTTCCTTTGGTGTGACTCAGGAGTACATTCAGACAACCATTCAGAAAGTTACTGTTGATTGTAAAC
AGTACGTTTGCAATGGTTTCCAGAAGTGTGAGCAATTACTGCGCGAGTATGGCCAGTTTTGTTCCA

AAATAAACCAGGCTCTCCATGGTGCCAATTTACGCCAGGATGATTCTGTACGTAATTTGTTTGCGAG
CGTGAAAAGCTCTCAATCATCTCCTATCATACCAGGTTTTGGAGGTGACTTTAATTTGACACTTCTA
GAACCTGTTTCTATATCTACTGGCAGTCGTAGTGCACGTAGTGCTATTGAGGATTTGCTATTTGACA
AAGTCACTATAGCTGATCCTGGTTATATGCAAGGTTACGATGATTGTATGCAGCAAGGTCCAGCATC
AGCTCGTGATCTTATTTGTGCTCAATATGTGGCTGGTTATAAAGTATTACCTCCTCTTATGGATGTTAA
TATGGAAGCCGCGTATACTTCATCTTTGCTTGGCAGCATAGCAGGTGTTGGCTGGACTGCTGGCTTA
TCCTCCTTTGCTGCTATTCCATTTGCACAGAGTATCTTTTATAGGTTAAACGGTGTTGGCATTACTCA
ACAGGTTCTTTCAGAGAACCAAAAGCTTATTGCCAATAAGTTTAATCAGGCTCTGGGAGCTATGCA
AACAGGCTTCACTACAACTAATGAAGCTTTTCGGAAGGTTCAGGATGCTGTGAACAACAATGCAC
AGGCTCTATCCAAATTAGCTAGCGAGCTATCTAATACTTTTGGTGCTATTTCCGCCTCTATTGGAGAC
ATCATACAACGTCTTGATGTTCTCGAACAGGACGCCCAAATAGACAGACTTATTAATGGCCGTTTG
ACAACACTAAATGCTTTTGTTGCACAGCAGCTTGTTCGTTCCGAATCAGCTGCTCTTTCCGCTCAAT
TGGCTAAAGATAAAGTCAATGAGTGTGTCAAGGCACAATCCAAGCGTTCTGGATTTTGTGGTCAAG
GCACACATATAGTGTCCTTTGTTGTAAATGCCCCTAATGGCCTTTACTTCATGCATGTTGGTTATTAC
CCTAGCAACCACATTGAGGTTGTTTCTGCTTATGGTCTTTGCGATGCAGCTAACCCTACTAATTGTAT
AGCCCCTGTTAATGGCTACTTTATTAAAACTAATAACACTAGGATTGTTGATGAGTGGTCATATACTG
GCTCGTCCTTCTATGCACCTGAGCCCATCACCTCCCTTAATACTAAGTATGTTGCACCACATGTGAC
ATACCAAAACATTTCTACTAACCTCCCTCCTCCTCTTCTCGGCAATTCCACCGGGATTGACTTCCAA
GATGAGTTGGATGAGTTTTTCAAAAATGTTAGCACCAGTATACCTAATTTTGGTTCTCTAACACAGA
TTAATACTACATTACTCGATCTTACCTACGAGATGTTGTCTCTTCAACAAGTTGTTAAAGCCCTTAAT
GAGTCTTACATAGACCTTAAAGAGCTTGGCAATTATACTTATTACAACAAATGGCCGTGGTACATTT
GGCTTGGTTTCATTGCTGGGCTTGTTGCCTTAGCTCTATGCGTCTTCTTCATACTGTGCTGCACTGGT
TGTGGCACAAACTGTATGGGAAAACTTAAGTGTAATCGTTGTTGTGATAGATACGAGGAATACGAC
CTCGAGCCGCATAAGGTTCATGTTCACTAATGA

附录 C
（资料性附录）
表达绿色荧光蛋白的重组水泡性口炎病毒构建（VSVΔG-MERSs-eGFP）

C.1 材料和试剂

Prime Star DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司；T4 DNA 连接酶及其它限制性内切酶均购自 NEB 公司；DL15000 DNA marker 和 DL5000 DNA marker 购自南京诺维赞生物科技（Vazyme）有限公司；质粒小量和中量提取试剂盒购自 Qiagen 公司；回收试剂盒购自 OMEGA 公司；胎牛血清（FBS）购自 Excell 公司；DMEM 细胞培养基购自 GIBCO 公司；磷酸钙转染试剂盒均购自 Invitrogen 公司；病毒 RNA 抽提试剂盒购自 Qiagen 生物公司；鼠源反转录酶（M-MLV）试剂盒购自 Invitrogen 公司。

C.2 方法

C.2.1 重组病毒（VSVΔG-MERSs-eGFP）的质粒构建

化学合成MERS-CoV S基因，根据特异引物进行PCR扩增。PCR产物经胶回收后克隆到pBlueScripII K S(+)载体上，并经过基因测序后将其命名为pBS-MERSs。质粒 pBS-MERS-S 经限制性酶 NheI 处理后，与 VSV 基因组转录质粒 pCI-Rz-VSV-eGFP-FL-R 连接，构建表达 MERS-CoV S 基因的重组 VSV 全长 cDNA 质粒，命名为 pCI-Rz-VSVΔG-eGFP-MERSs。经限制性内切酶 MluI 处理，切除 EGFP 基因，获得表达 MERS-CoV S 基因重组 VSV 全长 cDNA 质粒，命名为 pCI-Rz-VSVΔG-MERSs。

C.2.2 重组病毒（VSVΔG-MERSs-eGFP）的拯救

将以 5%FBS 的 DMEM 培养的 BHK-21 接种于六孔板中，培养过夜，当细胞生长密度达到 80%左右时，以 MOI=0.01 的剂量将表达 T7 聚合酶的重组痘病毒 vTF7-3 感染细胞 1 h 之后将全长质粒及辅助质粒 pBS-N、pBS-P、pBS-L 以 4：2：1：1 的比例混合利用磷酸钙转染试剂转染 BHK-21 细胞。转染 72 h 后，收获细胞上清液在 Vero E6 细胞中连续传代直到观察到明显的细胞病变，收获重组病毒，保存于-70℃冰箱，命名为 VSVΔG-MERSs-eGFP。

C.2.3 重组病毒（VSVΔG-MERSs-eGFP）的鉴定

将重组病毒 VSVΔG-MERSs-eGFP 按 MOI=0.01 分别感染 Vero E6 细胞，同时设空白 Vero E6 细胞作为阴性对照。感染 36 h 后收集细胞，经细胞裂解液裂解处理后进行 SDS-PAGE 电泳，并将蛋白转印至硝酸纤维膜 NC 膜，5%脱脂乳封闭过夜。转印的样品分别用鼠抗 MERS-CoV S 蛋白血清（1∶50）以及鼠抗 VSV 血清（1:100）为一抗，Alexa Fluor 680 标记的驴抗小鼠 IgG（1：6000）为二抗，孵育结束后彻底漂洗 NC 膜，然后利用红外扫描仪进行 western blot 分析。

C.2.4 重组病毒（VSVΔG-MERSs-eGFP）的扩增与毒价测定

初代重组病毒VSVΔG-MERSs-eGFP按1%的量接种已长成单层的Vero E6细胞，37℃，5% CO_2培养箱培2~3天，荧光显微镜下观察，待大部分细胞呈GFP荧光阳性时收获细胞培养上清病毒液，分装后冻存于-70℃。同时取1支进行毒价测定：将病毒液用含5%FBS的DMEM液进行10倍梯度稀释，向已长成单层的Vero E6细胞的六孔板中每孔加100μL，37℃ 5% CO_2培养箱培养，培养48h后观察绿色荧光蛋白表达。按Karber方法计算病毒液的毒价（$TCID_{50}$/50μL）。