ICS 11.220
B 41

T/CVDA

团体标准

T/CVDA 1—2022

动物西尼罗病毒中和抗体检测技术

Detecting technique of neutralization antibody against West Nile virus 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
6 动物血清的采集 2
7 PRNT 实验操作 2
7.1 安全防护 2
7.2 材料准备 2
7.2.1 细胞 2
7.2.2 待测血清 2
7.2.3 检测用细胞板 2
7.3 检测操作 3
7.3.1 血清的稀释 3
7.3.2 病毒与血清的中和 3
7.3.3 接种细胞 3
7.3.4 蚀斑计数 3
8 结果观察与判定 4
8.1 观察顺序 4
8.2 蚀斑观察结果判定 4
8.2.1 试验成立条件 4
8.2.2 结果判定与效价计算 4
A.1 材料和试剂 1
A.2 方法 1
A.2.1 表达质粒构建 1
A.2.2 细胞转染与克隆筛选 1
A.2.3 克隆细胞株的鉴定 1
B.1 材料和试剂 1
B.2 方法 1
B.2.1 WNV 复制子质粒构建 1
B.2.2 △WNV 病毒的初次包装 1

前　言

本标准参照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，中华人民共和国宁波海关，黑龙江省动物疫病预防与控制中心。

本标准主要起草人：步志高、华荣虹、黄素文、张永国、刘任强。

本标准为首次发布。

动物西尼罗病毒中和抗体检测技术

1 范围

本标准规定了用于动物西尼罗病毒血清中和抗体测定的蚀斑减少中和试验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西尼罗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/T 6682-2008 分析实验室用水规格和试验方法。

GB 19489-2008 实验室 生物安全通用要求。

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

WNV：西尼罗病毒（West Nile Virus）；

BHK-21：幼仓鼠肾细胞（Baby Hamster Kidney-21）；

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

PRNT：蚀斑减少中和试验（Plaque-Reduction Neutralization Test）；

DMEM：Dulbecco 改良的Eagle培养基（Dulbecco's Modified Eagle's Medium）；

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

PFU：蚀斑形成单位（Plaque Forming Unit）；

FFU：荧光灶单位（Fluorescence Focus Units）；

FBS：胎牛血清（Fetal Bovine Serum）；

NA：中和抗体（Neutralizing Antibody）。

4 试剂和材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

4.1 水：GB/T 6682-2008，二级水。

4.2 西尼罗病毒抗体阴性血清（由制标单位提供）。

4.3 西尼罗病毒抗体阳性血清（由制标单位提供）。

4.4 磷酸盐缓冲液（PBS）（见C.1）。

4.5 含10%胎牛血清的DMEM液培养基（见C.2）。

4.6 含5%胎牛血清的DMEM液培养基（见C.3）。

4.7 结晶紫-甲醛固定染色液（见C.4）。

4.8 BWNV-CME细胞（稳定表达WNV C-prM-E蛋白的BHK-21细胞系，由制标单位提供）。

4.9 △WNV病毒（缺失CME基因表达GFP的WNV复制子病毒，由制标单位提供）。

4.10 胎牛血清（FBS）。
4.11 0.25%胰酶-EDTA液。
4.12 青-链霉素溶液（10000 U-10000 μg/mL,100×）。

5 器材和设备

5.1 移液器，50 μL~200 μL（±2%）。
5.2 24孔细胞培养板。
5.3 37℃ 5%二氧化碳培养箱。
5.4 倒置显微镜。
5.5 普通冰箱和超低温冰箱。
5.6 细胞计数器。
5.7 20 μL~200 μL 吸头。
5.8 II级生物安全柜。
5.9 EP管：即eppendorf管、微型离心管。

6 动物血清

无菌采集动物血液，室温或37℃静置60 min。4℃放置1 h至过夜后，6000 r/min离心5 min，收集上清，-20℃以下保存待检。

样品信息应记录完整，确保可追溯性。

样品采集人员应注意采取佩戴口罩、手套，着长袖工作服等防护措施。

7 PRNT 实验操作

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佩戴口罩、手套，着长袖工作服等防护措施。废弃物处理应按BSL-2实验室废弃物安全处理标准操作程序进行。

7.2 材料准备

7.2.1 细胞

按常规方法用含10%胎牛血清的DMEM液培养BWNV-CME细胞，1个75 cm^2 的细胞培养瓶(20 mL 培养液)细胞培养48 h后，用于24孔细胞培养板(细胞数约为1×10^5细胞/孔)的检测。

7.2.2 血清处理

待测血清在56℃下灭活30 min。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，但不要超过样品管高度。

7.2.3 检测用细胞板

将培养48 h的BWNV-CME细胞用PBS润洗一次，弃去PBS后再用0.25%胰酶-EDTA液消化细胞，待细胞圆缩且部分脱落时，加入含5%胎牛血清的DMEM液吹打分散细胞，以0.5 mL/孔接种24孔细胞培养板（1×10^5细胞/孔），置37℃ CO_2含量为5%培养箱中培养过夜长成单层后用于检测。每个检测批次除了需要待测血清样品测定板若干以外，还需设阳性血清对照板孔和阴性血清对照板孔以及不接毒细胞对照板孔各2孔。

7.3 检测操作

7.3.1 血清的稀释

待检血清稀释液为DMEM液。取6支1.5mL EP管，于第1管中将灭活的待检血清样品按1：5稀释；再于第2~5管中按2倍梯度将血清稀释为1：10，1：20，1：40，1：80；第6管中为DMEM液，样品稀释方法如表1所示。阳性对照血清按1：5稀释。阴性对照血清按1：5稀释。

7.3.2 病毒与血清的中和

将△WNV病毒用DMEM液稀释至100 PFU/0.1 mL。向各血清稀释管中加入等体积的稀释病毒液（100 PFU/ 0.1 mL），盖上管盖，轻轻震荡混匀后置37℃温箱中，中和60~90 min。

表1 血清稀释与病毒加样表（举例）

	管1	管2	管3	管4	管5		管6
DMEM液（μL） 待检血清（μL）	320 80	200 200	200 200	200 200	200 200	200丢弃	200 /
△WNV病毒液（μL）	200	200	200	200	200		200
血清终稀释度	1：10	1：20	1：40	1：80	1：160		病毒对照

注：表中样品体积按4个重复孔所需体积为例，可另按实际设置重复孔数计算；可按需要增加血清稀释度。

7.3.3 接种细胞

7.3.3.1 对长成单层的BWNV-CME细胞24孔板进行标记，将血清-病毒混合液加入相应细胞板孔内，100 μL/孔。吸取不同稀释度血清-病毒混合液时更换吸头。轻轻震荡混匀。

7.3.3.2 置37℃、5% CO_2 培养箱中培养6 h。

7.3.3.3 每孔加入600 μL 3%甲基纤维素，置37℃、5% CO_2 培养箱中培养。

7.3.3.4 培养144~168 h（6~7天）后，进行蚀斑计数。

7.3.4 蚀斑计数

7.3.4.1 培养6~7天后，弃掉细胞板中培养基与覆盖物。

7.3.4.2 加入PBS洗一次，1 mL/孔。

7.3.4.3 加入结晶紫-甲醛固定染色液，1 mL/孔，室温于摇床上轻摇20 min。

7.3.4.4 弃去染液，用去离子水洗细胞3次，1 mL/孔，轻摇，3 min/次。

7.3.4.5 弃去细胞板中液体，将细胞板轻轻倒扣在吸水纸上吸去残液。

7.3.4.6 倒置细胞板，对各细胞板孔进行蚀斑计数。

8 结果观察与判定

8.1 观察顺序

按病毒对照孔、血清对照孔、待测血清孔顺序观察。

8.2 蚀斑观察结果判定

8.2.1 试验成立条件

对细胞板进行蚀斑计数。病毒对照孔蚀斑数量应为20 PFU~200 PFU之间；不接毒细胞对照孔观察结果应无特异性蚀斑。相对于病毒对照孔，阳性血清对照孔蚀斑数量减少率应大于或等于90%；阴性血清对照孔蚀斑数量减少率应小于50%。

8.2.2 结果判定与效价计算

8.2.2.1 样品孔蚀斑数量相对于病毒对照孔减少90%及以上判定为阳性。
8.2.2.2 蚀斑数量减少率≥90%对应的血清最大稀释倍数为该样品的中和抗体效价。

附录A
（资料性附录）
BWNV-CME细胞系的构建

A.1 材料和试剂

BHK-21细胞；pCAGneo质粒；大肠杆菌感受态细胞、质粒提取试剂盒、转染试剂、限制性内切酶、胎牛血清、DMEM培养基、G418、细胞培养用青-链霉素、0.25%胰酶，标记抗体均为商品化试剂。

A.2 方法

A.2.1 表达质粒构建

以WNV病毒NY99株基因组序列（GenBank序列号DQ211652）为参考序列，对编码C-prM-E蛋白的基因序列按哺乳动物仓鼠偏嗜性密码子进行密码子优化。采用基于PAS(PCR-based Accurate Synthesis)的方法，设计全长拼接引物，在引物的两端各设计了保护性碱基，人工合成基因组片段，通过克隆位点 *Sac* I 和 *Xho* I连接到真核表达质粒pCAGneo的CMV启动子下游构建表达质粒，连接产物转化DH5α后，挑选重组克隆、经酶切和测序鉴定，获得阳性克隆后用试剂盒大量制备质粒，命名为pCAG-WNV-CME，用SspI进行线性化后冻存于-20℃备用。

A.2.2 细胞转染与克隆筛选

选择生长状态良好的BHK-21细胞消化传代至 24 孔板中（1×10^5细胞/孔），待 BHK-21细胞长至 90%满时，按照FuGENE® HD Transfection Reagent转染试剂盒操作说明用线性化后的重组质粒pCAG-WNV-CME转染细胞。转染 48 h 后加入含 G418 (1 000 μg/ m L) 选择性培养基进行加压培养，4 d 后将细胞用胰酶消化，以有限稀释法传代于 96 孔板中继续培养，6 d 后在倒置显微镜下观察每孔细胞的克隆数目。挑选含有 1 个细胞集落(即1 个细胞团块) 的孔相继在 24 孔板、6 孔板、细胞培养瓶中扩大培养，同时对各细胞用WNV E蛋白特异性单克隆抗体进行IFA鉴定，筛选IFA信号较强的细胞克隆。获得稳定表达C-prM-E蛋白的细胞克隆，命名为BWNV-CME。

A.2.3 克隆细胞株的鉴定

将BWNV-CME细胞进行裂解，按比例加入蛋白电泳上样缓冲液，于沸水中煮10 min，后置冷水中降温，将样品瞬时离心以防挂壁；准备蛋白电泳胶，安装电泳槽，样品混匀后每孔加样5 μL，预染蛋白Marker点样1.5 μL；电泳，先低压80 V，30 min，然后保持120 V。NC膜先用去离子水浸湿10 min，然后电转液浸湿10 min，上、下滤纸板在电转液中浸湿10 min；将蛋白胶取出，按照下滤纸板、膜、胶及上滤纸板顺序放置于半干转膜仪上，电压10 V，转印45 min；转印结束后将NC膜放入4%脱脂乳(2 g脱脂乳+50 mL PBS)中，4℃封闭过夜或37℃ 2 h；分别加入200倍稀释的小鼠抗WNV PrM蛋白以及鼠抗WNV E蛋白单克隆抗体作为一抗，37℃孵育1 h；PBST(含有0.05% Tween-20的PBS)洗4次，每次4 min，在摇床上摇动洗涤；加5000倍稀释的红外荧光标记山羊抗小鼠IgG为二抗，37℃孵育1 h，避光；PBST洗4次，每次4 min；Odyssey红外荧光扫描仪扫膜并保存图片。

附录B
（资料性附录）
△WNV病毒的构建与毒价测定

B.1 材料和试剂

BWNV-CME细胞；pCI-neo质粒；大肠杆菌感受态细胞、质粒提取试剂盒、转染试剂、限制性内切酶、胎牛血清、DMEM培养基、G418、细胞培养用青-链酶素、胰酶，细胞培养板，细胞培养瓶均为商品化试剂耗材。

B.2 方法

B.2.1 WNV 复制子质粒构建

以WNV病毒NY99株基因组序列(Genbank序列号DQ211652）为参考序列，采用基于 PAS(PCR-based Accurate Synthesis)的方法，设计全长拼接引物，在引物的两端各设计了保护性碱基，人工合成基因组片段，通过克隆位点 *Xho*Ⅰ 和 *Xba*Ⅰ连接到真核表达质粒pCI-neo的CMV启动子下游构建WNV复制子质粒，将WNV复制子基因组中结构蛋白C-prM-E编码序列替换为绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因序列，保留C蛋白N端22氨基酸残基以及E蛋白羧基端20氨基酸残基，获得的重组质粒命名为pWNVrepGFP-dCME。

B.2.2 △WNV 病毒的初次包装

以含有 10% FBS 的DMEM 培养基为生长培养基，1：4传代培养 BWNV-CME细胞，将对数生长期的BWNV-CME细胞以5×10^5/mL 接种 6孔细胞培养板，过夜培养，将质粒pWNVrep-GFP-dCME加入 Opti-MEM中制成 DNA 稀释液，每3 μg 质粒需要200 μL opti-MEM，加入 20 μL X-treme HP 转染试剂，室温静置15 min。将 DNA 转染试剂复合物逐滴加入含有BWNV-CME细胞的培养液中，72 h 后观察荧光。收取上清，离心过滤后储存于-70℃备用。

B.2.3 △WNV病毒的扩增与毒价测定

将初次包装的△WNV病毒按1%的量接种已长成单层的BWNV-CME细胞，37℃，CO_2培养箱培养3~5天，荧光显微镜下观察，待大部分细胞呈绿色荧光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%胎牛血清的DMEM液进行10倍梯度稀释，向已长成单层的BWNV-CME细胞的六孔板中每孔加100μL，37℃ 5% CO_2培养箱培养10 h后向每孔中加入与培养基等体积的3%甲基纤维素，培养48 h后观察绿色荧光蛋白表达。或培养6天后用结晶紫-甲醛固定染色液固定染色后进行病毒蚀斑计数。计算病毒效价。

附录C
（规范性附录）
试剂配制

C.1 磷酸盐缓冲液(PBS)

称取氯化钠85.00 g、磷酸氢二钠15.49 g、磷酸二氢钠2.03 g，加去离子水溶解，定容至10 L，以2 mol/L氢氧化钠溶液调至pH 7.4。高压灭菌后室温保存。

C.2 含10%胎牛血清的DMEM液培养基

无菌量取DMEM 培养基440 mL，加入胎牛血清50 mL、7.5%碳酸氢钠溶液5 mL、青-链霉素溶液5 mL。4℃保存。

C.3 含5%胎牛血清的DMEM液培养基

无菌量取DMEM 培养基465 mL，加入胎牛血清25 mL、7.5%碳酸氢钠溶液5 mL、青-链霉素溶液5 mL。4℃保存。

C.4 结晶紫-甲醛固定染色液

称取结晶紫 0.2 g，用 20 mL 无水乙醇充分溶解；加入 PBS 170 mL，加入福尔马林（40%甲醛）10 mL，充分混匀后用滤纸过滤，固定染色液定容至 200 mL，室温保存。