

# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2840—2015

---

## 猪细小病毒间接ELISA抗体检测方法

**Indirect ELISA for detection of antibodies against  
Porcine parvovirus**

2015-10-09 发布

2015-12-01 实施

---

**中华人民共和国农业部** 发布

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:中国动物卫生与流行病学中心。

本标准主要起草人:陈义平、南文龙、周洁、陆明哲、魏荣。

## 猪细小病毒间接 ELISA 抗体检测方法

### 1 范围

本标准规定了细小病毒科细小病毒属的猪细小病毒抗体的间接 ELISA 检测方法。  
本标准适用于猪细小病毒抗体监测以及流行病学调查。

### 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 6682 分析实验室用水规格和实验方法

GB 19489 实验室生物安全通用要求

GB/T 27401 实验室质量控制规范 动物检疫

中华人民共和国农业部公告〔2003〕第 302 号 兽医实验室生物安全技术管理规范

### 3 缩略语

下列缩略语适用于本文件:

PPV:猪细小病毒 Porcine parvovirus

ELISA:酶联免疫吸附试验 Enzyme-linked immunosorbent assay

OD:光密度 optical density

r/min:转/分钟 rotations per minute

### 4 试剂

#### 4.1 猪细小病毒 VP2 重组蛋白(re-VP2)

克隆猪细小病毒结构蛋白 VP2 抗原优势区基因,用 pET-32a 表达载体进行原核表达,亲和层析法纯化重组蛋白。获得的重组蛋白浓度应 $\geq 1$  mg/mL,纯度应 $\geq 95\%$ 。具体过程见附录 A。

#### 4.2 阳性血清对照

选取 5 月龄健康猪 2 头,用猪细小病毒疫苗按规定剂量进行免疫,间隔 3 周免疫 2 次,第二次免疫 1 个月后将开始采血分离血清,用血凝抑制试验测定其抗体效价。当抗体的血凝抑制效价达到 1:1 024 时采血分离血清,将血凝抑制效价为 1:1 024 的阳性血清用样品稀释液(参见 B.4)进行 1:50 稀释,即为阳性血清对照。

#### 4.3 阴性血清对照

采集无母源抗体、未免疫猪细小病毒疫苗的健康猪血清,经血凝抑制试验检测,结果为猪细小病毒抗体阴性,用样品稀释液(参见 B.4)进行 1:50 稀释,即为阴性血清对照。

4.4 包被液、洗涤液、封闭液、样品稀释液、酶标抗体稀释液、底物显色液、终止液配制方法分别见 B.1、B.2、B.3、B.4、B.5、B.6、B.7。

### 5 器材和设备

一次性注射器、恒温培养箱、震荡混匀仪、移液器(200  $\mu$ L、1 000  $\mu$ L)、多道移液器(200  $\mu$ L)、酶标板、酶联免疫检测仪等。

## 6 血清样品的处理

### 6.1 血清样品的采集和处理

静脉采血,每头猪不少于 2 mL。血液凝固后分离血清,4 000 r/min 离心 10 min,用移液器吸出上层血清。

### 6.2 血清样品的储存和运输

血清样品置-20℃以下冷冻保存。运输时确保低温运送,并及时送达,以防血清样品腐败。按照中华人民共和国农业部〔2003〕第 302 号公告的规定进行样品的生物安全标识。

## 7 间接 ELISA 抗体检测操作方法

### 7.1 包被抗原

以纯化的猪细小病毒 VP2 重组蛋白(re-VP2)作为包被用抗原,将重组蛋白 re-VP2 用包被液稀释至 3 μg/mL,每孔加入 100 μL(每孔抗原包被量为 300 ng),37℃包被 2 h,用洗涤液洗板 3 次,每次 5 min。

### 7.2 封闭

每孔加入 200 μL 封闭液,37℃封闭 2 h,洗板同上。

### 7.3 加待检血清及阳性血清对照、阴性血清对照

将待检血清用样品稀释液进行 1:50 稀释,每孔加入 100 μL,每板同时设置两孔阳性血清对照、两孔阴性血清对照。当待检血清样品较多时,可根据试验进度,提前进行样品稀释,再一并加样,以确保所有待检样品的反应时间准确、一致。37℃作用 1 h,洗板同上。

### 7.4 加酶标抗体

将兔抗猪酶标抗体用酶标抗体稀释液稀释至工作浓度,每孔加入 100 μL,37℃作用 1 h,洗板同上。

### 7.5 加底物显色液

每孔加入 100 μL 底物显色液,37℃避光显色作用 10 min。

### 7.6 加终止液

每孔加入 100 μL 终止液终止反应,10 min 之内测定 OD<sub>450</sub> 值。

### 7.7 结果判定

在酶联免疫检测仪上读取 OD<sub>450</sub> 值,计算阳性血清对照 OD<sub>450</sub> 平均值 OD<sub>P</sub>、阴性血清对照 OD<sub>450</sub> 平均值 OD<sub>N</sub>。阳性血清对照 OD<sub>450</sub> 平均值 OD<sub>P</sub>≥0.5,阴性血清对照 OD<sub>450</sub> 平均值 OD<sub>N</sub>≤0.2 时,试验成立。待检血清样品的 OD<sub>450</sub>≥0.2×OD<sub>P</sub>+0.8×OD<sub>N</sub> 判为阳性,反之判为阴性。

## 8 注意事项

- 8.1 相关试剂需在 2℃~8℃保存,使用前平衡至室温。
- 8.2 操作时,注意取样或稀释准确,并注意更换吸头。
- 8.3 底物溶液避光保存,避免与氧化剂接触。
- 8.4 终止液有腐蚀作用,使用时避免直接接触。
- 8.5 废弃物处理参照中华人民共和国农业部〔2003〕第 302 号公告的规定进行。

**附 录 A**  
(规范性附录)  
**猪细小病毒 VP2 蛋白的表达及纯化**

**A. 1 材料和试剂**

猪细小病毒 NADL - 2 株;大肠杆菌 DH5a 和 BL21 (DE3)感受态细胞、pMD18 - T 克隆载体、pET - 32a 表达载体、核酸提取试剂盒、质粒提取试剂盒、限制性内切酶、蛋白纯化试剂盒、培养基均为商品化试剂。

**A. 2 器材和设备**

恒温培养箱、高速离心机、PCR 扩增仪、核酸电泳仪和水平电泳槽、凝胶成像系统(或紫外透射仪)、恒温空气浴摇床、移液器(10  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1 000  $\mu$ L)、分光光度计等。

**A. 3 引物序列**

VP2 - P1:5'- AACAGGATCCCACAGTGACATTATG - 3'

VP2 - P2:5'- AGAAAGCTTATGCTTTGGAGCTCTTC - 3'

**A. 4 猪细小病毒结构蛋白 VP2 抗原优势区基因序列**

本标准表达的猪细小病毒结构蛋白 VP2 抗原优势区基因序列如下:

CACAGTGACATTATGTTCTACACAATAGAAAATGCAGTACCAATTCATCTTCTAAGAAC  
AGGAGATGAATTCTCCACAGGAATATATCACTTTGACACAAAACCACTAAAATTAACTC  
ACTCATGGCAAACAAACAGATCTCTAGGACTGCCTCCAAAACCTACTAACTGAACCTAC  
CACAGAAGGAGACCAACACCCAGGAACACTACCAGCAGCTAACACAAGAAAAGGTTA  
TCACCAAACAATTAATAATAGCTACACAGAAGCAACAGCAATTAGGCCAGCTCAGGTA  
GGATATAATACACCATACATGAATTTTGAATACTCCAATGGTGGACCATTCTAACTCCTA  
TAGTACCAACAGCAGACACACAATATAATGATGATGAACCAAATGGTGCTATAAGATTT  
ACAATGGATTACCAACATGGACACTTAACCACATCTTCACAAGAGCTAGAAAGATACA  
CATTCAATCCACAAAGTAAATGTGGAAGAGCTCCAAAGCAT

**A. 5 方法****A. 5.1 VP2 抗原优势区基因的表达质粒构建**

将 PPV 接种 PK15 细胞,在 5% CO<sub>2</sub> 的条件下 37℃ 培养 24 h~36 h,当 70% 的细胞出现细胞病变时,收集培养物,反复冻融 3 次。用核酸提取试剂盒提取病毒 DNA,然后用 VP2 - P1 和 VP2 - P2 引物

扩增 VP2 基因,琼脂糖凝胶电泳并纯化回收相应的扩增片段,片段大小为 510 bp。纯化产物连接 pMD18-T 克隆载体,转化 DH5a 感受态细胞,筛选获得的重组阳性质粒命名为 pMD18-T-VP2。用 BamH I 和 Hind III 双酶切 pMD18-T-VP2 和 pET-32a,将 VP2 基因片段连接到 pET-32a 表达载体,转化 DH5a 感受态细胞,筛选获得的重组阳性质粒命名为 pET-32a-VP2。

#### A.5.2 VP2 抗原优势区基因的表达与纯化

将 pET-32a-VP2 转化 BL21(DE3)感受态细胞,筛选获得含重组质粒的阳性菌株。取重组 BL21(DE3)菌种 5  $\mu$ L,接种至 5 mL 含 50  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基(蛋白胨 1%,氯化钠 1%,酵母提取物 0.5%)。37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 值为 0.4~0.6 时,加入终浓度为 1 mmol/L 的异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)进行诱导,继续 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 4 h。按照蛋白纯化试剂盒说明书纯化目的蛋白(即 VP2 重组蛋白),目的蛋白大小约 39.1 kDa。

#### A.5.3 重组蛋白的纯度及浓度测定

取 5  $\mu$ L 重组蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色,用蛋白密度扫描分析纯度,重组蛋白的纯度应 $\geq$ 95%;用紫外分光光度计测定重组蛋白在 280 nm 和 260 nm 波长的 OD 值,计算蛋白浓度,重组蛋白的浓度应 $\geq$ 1 mg/mL。将检测合格的重组蛋白,分装后-20 $^{\circ}$ C 保存。

**附录 B**  
**(资料性附录)**  
**溶液的配制**

**B.1 包被液(碳酸盐缓冲液,pH 9.6)**

NaHCO <sub>3</sub> (分析纯)	2.98 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (分析纯)	1.5 g

加双蒸水至 1 000 mL,混匀。

**B.2 洗涤液(磷酸盐缓冲液—吐温,PBST,pH 7.4)**

NaCl(分析纯)	8.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (分析纯)	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O(分析纯)	2.9 g
KCl(分析纯)	0.2 g
硫柳汞(分析纯)	0.1 g
Tween20(分析纯)	0.5 mL

加双蒸水至 1 000 mL,调至 pH 7.4。

**B.3 封闭液(10%小牛血清/PBST 溶液,pH 7.4)**

吸取小牛血清(优级)100 mL,加 PBST 至 1 000 mL,混匀。

**B.4 样品稀释液(磷酸盐缓冲液,pH 7.4)**

NaCl(分析纯)	8.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (分析纯)	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O(分析纯)	2.9 g
KCl(分析纯)	0.2 g
硫柳汞(分析纯)	0.1 g

加双蒸水至 1 000 mL,调至 pH 7.4。

**B.5 酶标抗体稀释液**

同 B.3 封闭液。

**B.6 底物显色液(TMB-过氧化氢尿素溶液)****B.6.1 底物液 A**

TMB(分析纯)200 mg,无水乙醇(或 DMSO)100 mL,加双蒸水至 1 000 mL,混匀。

**B.6.2 底物缓冲液 B**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (分析纯)	14.6 g
柠檬酸(分析纯)	9.33 g
0.75%过氧化氢尿素	6.4 mL

加双蒸水至 1 000 mL, 调至 pH 5.0~5.4。

**B.6.3** 将底物液 A 和底物缓冲液 B 按 1:1 混合, 即成底物显色液。

**B.7 终止液(2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)**

将 22.2 mL 浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(98%) 缓慢滴加入 150 mL 双蒸水中, 边加边搅拌, 加双蒸水至 200 mL。

---