



中华人民共和国国家标准

GB/T 35906—2018

猪瘟抗体间接 ELISA 检测方法

Indirect ELISA to detect antibody against classical swine fever virus

2018-02-06 发布

2018-09-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

订单号: 0100191211052085 防伪编号: 2019-1211-0434-4808-7909 购买单位: 全国动物卫生标准化技术委员会

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

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:中国兽医药品监察所。

本标准主要起草人:王琴、徐璐、范学政、赵启祖、邹兴启、朱元源、宁宜宝。

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

引 言

牛病毒性腹泻/粘膜病病毒在牛的感染比较严重,偶尔也有猪自然感染的报道。在田间,牛病毒性腹泻/粘膜病病毒通常对出生后的猪无致病性,仅对胎猪有致病性。虽然牛病毒性腹泻/粘膜病病毒可在猪群中传播,但这种传播是很有限的。在没有新的传染源引入的前提下,猪群中已经存在的牛病毒性腹泻/粘膜病病毒会被逐渐清除,病毒的传染链会终止。牛源牛病毒性腹泻/粘膜病病毒是猪感染牛病毒性腹泻/粘膜病病毒的主要来源,主要与牛猪混养程度或使用了污染牛病毒性腹泻/粘膜病病毒的牛源材料有关。在我国生猪饲养的主力主要为大中型养殖场,很少存在猪牛混养情况,因此不会导致牛病毒性腹泻/粘膜病病毒在猪群中的流行传播。另外,猪用疫苗生产中所使用的牛源原材料均需进行牛病毒性腹泻/粘膜病病毒等外源病毒检测,因此,疫苗生产工艺的提高也彻底切断了牛病毒性腹泻/粘膜病病毒在猪群中传播途径。最后,猪瘟疫苗在我国的免疫率接近 100%。而猪瘟病毒与牛病毒性腹泻/粘膜病病毒为同属病毒,免疫上存在一定的交叉保护。猪群中存在牛病毒性腹泻/粘膜病抗体阳性的可能性微乎其微。因此,本标准主要针对猪群中猪瘟疫苗免疫后的抗体检测,不用于对个体进行猪瘟抗体和牛病毒性腹泻/粘膜病抗体的鉴别检测。

猪瘟抗体间接 ELISA 检测方法

1 范围

本标准规定了猪瘟抗体的间接 ELISA 检测方法。

本标准适用于猪瘟抗体检测。

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。凡标注日期的引用文件,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。

兽医实验室生物安全技术管理规范(中华人民共和国农业部公告第 302 号)

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CSFV:猪瘟病毒(Classical Swine Fever Virus)

ELISA:酶联免疫吸附试验(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

HRP:辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase)

OD:光密度(Optical Density)

4 试剂

4.1 猪瘟病毒 E2 蛋白:见附录 A。

4.2 标准阳性血清:猪瘟疫苗免疫仔猪制备,荧光抗体病毒中和试验检测中和抗体效价 $\geq 1:20480$ 。

4.3 标准阴性血清:无母源抗体、未免疫猪瘟疫苗的仔猪血清,荧光抗体病毒中和试验病毒抗体检测为阴性。

4.4 酶结合物:商品化的 HRP 标记的抗猪 IgG 抗体,工作浓度参照产品说明书。

4.5 包被液:见附录 B 中的 B.1。

4.6 磷酸盐缓冲液:见 B.2。

4.7 封闭液:见 B.3。

4.8 1×洗涤液:见 B.4。

4.9 稀释液:见 B.5。

4.10 底物液 A:见 B.6。

4.11 底物液 B:见 B.7。

4.12 终止液:见 B.8。

4.13 商品化试剂盒:可选择同类的商品化试剂盒。

5 器材和设备

- 5.1 37℃温箱。
- 5.2 酶标仪。
- 5.3 各种规格的微量移液器(20 μL、200 μL、1 000 μL)和吸头。
- 5.4 多道移液器(200 μL)。
- 5.5 酶联反应板。
- 5.6 血清稀释板:96孔一次性U型血凝板或96孔细胞培养板。
- 5.7 一次性注射器(5 mL~10 mL)。

6 血清样本的采集及处理

6.1 样本采集及处理

采集静脉血时,每头猪使用一个注射器。建议进行前腔静脉或耳静脉无菌采血,不少于2 mL。室温静置于斜面2 h,待血液自然凝固后,置2℃~8℃冰箱中放置不少于2 h,4 000 r/min离心10 min。用移液器小心吸出上层血清。

6.2 血清样本的存放与运送

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-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。按照《兽医实验室生物安全技术管理规范》进行样品的生物安全标识。

7 操作步骤

- 7.1 包被:用包被液将猪瘟病毒E2蛋白稀释至0.25 μg/mL,按100 μL/孔加入到酶联反应板中,2℃~8℃包被16 h。包被结束后,弃去孔中液体,每孔加入1×洗涤液300 μL,洗涤1次。
- 7.2 封闭:每孔加入新鲜配制的封闭液300 μL,2℃~8℃封闭24 h。封闭结束后,弃去孔中液体,每孔加入1×洗液300 μL,洗涤1次,即为抗原包被板。抗原包被板若不及时使用,则可将孔中液体在吸水材料上拍干,于室温中干燥(温度25℃±2℃,湿度≤40%)1 h。装于铝箔袋中,抽真空,置于2℃~8℃保存备用。
- 7.3 加稀释液:进行血清检测时,向抗原包被板中加入稀释液,50 μL/孔。
- 7.4 血清的稀释和加样:将待检血清、标准阴性、阳性对照血清于血清稀释板中分别作1:50稀释后,按位序分别向抗原包被板中加入稀释后的样本,50 μL/孔,其中标准阴、阳性对照血清各加2孔。充分混匀后,37℃温箱中反应30 min。吸取不同血清时需要更换吸头。
- 7.5 洗涤:弃去孔中液体,每孔加入300 μL洗涤液,室温放置3 min,洗涤3次,甩干洗涤液。
- 7.6 加酶结合物和孵育:用稀释液将酶结合物稀释至工作浓度,向每反应孔加入100 μL。37℃温箱孵育30 min。
- 7.7 洗涤:同7.5。
- 7.8 加底物和显色:将底物液A和底物液B等体积混合,混合后立即加入到抗原包被板中,每孔100 μL,室温避光显色10 min,每孔加入100 μL终止液(见B.8)。
- 7.9 每孔加入终止液100 μL。
- 7.10 在酶联免疫检测仪450 nm波长处读取各孔的OD值数,并以620 nm或650 nm作为背景参考波

长,以去除背景值,15 min 内完成。样本 OD 值=OD_{450 nm} - OD_{620 nm/650 nm}。

7.11 结果计算:

阴性对照平均值见式(1):

$$\bar{N} = \frac{(N_1 + N_2)}{2} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

\bar{N} —— 阴性对照孔平均值;

N_1 —— 阴性对照孔 1 的 OD 值;

N_2 —— 阴性对照孔 2 的 OD 值。

阳性对照平均值见式(2):

$$\bar{P} = \frac{(P_1 + P_2)}{2} \dots\dots\dots(2)$$

式中:

\bar{P} —— 阳性对照孔平均值;

P_1 —— 阳性对照孔 1 的 OD 值;

P_2 —— 阳性对照孔 2 的 OD 值。

阳性率见式(3):

$$IE = \frac{S}{\bar{P}} \times 100\% \dots\dots\dots(3)$$

式中:

IE —— 阳性率;

S —— 样本 OD 值;

\bar{P} —— 阳性对照孔平均值。

7.12 试验成立条件:当标准阳性对照样本 OD 值在 1.0~3.5 范围内,标准阴性对照 IE 值 \leq 8%时,试验成立。否则,应重新检测。

7.13 结果判定:当待检血清样本的 IE 值 \geq 10%时,判为猪瘟疫抗体阳性;当血清样本的 IE 值 \leq 8%时,判为猪瘟疫抗体阴性;当血清样本的 IE 值在 8%~10%之间时,判为可疑。可疑结果可在数日后重新采样检测。如仍在此范围,判为阴性。

7.14 采用商品化试剂盒时,按其说明书进行操作和判定。

全国动物卫生标准化技术委员会

附录 A

(规范性附录)

猪瘟疫病毒 E2 蛋白的表达及纯化

A.1 材料和试剂

猪瘟疫化弱毒疫苗株;大肠杆菌感受态细胞、pFastBac1 质粒、DH10Bac 感受态细胞、Sf9 细胞、质粒提取试剂盒、转染试剂、无血清培养基均为商品化试剂。

A.2 引物序列

P1-1: 5'>ATAGGATCCACCATGGCATTTCCTCATCTGCTTGATAAAAAGTATTAAG<3'
 P2-1: 5'>TAAGCTTACTTGGTACCGTGATGGTGATGGTGATGTCCCATACCAGCGGCG
 AGTTGTTCTGTTAGAACTACGTAGGTCACATCAGC<3'
 M13F: 5'>GTTTTCCCAGTCACGAC<3'
 M13R: 5'>CAGGAAACAGCTATGAC<3'

A.3 方法

A.3.1 重组转移载体的构建

猪瘟疫化弱毒疫苗株 RNA 的提取、反转录合成病毒 cDNA。再用引物 P1-1 和 P2-1 扩增猪瘟疫化弱毒疫苗株基因,琼脂糖凝胶纯化,将纯化产物和载体 pFastBac1 分别用 BamHI/HindIII 酶切、连接,转化大肠杆菌感受态细胞,筛选获得的重组转移载体。

A.3.2 重组杆粒的构建

将重组转移载体转化 DH10Bac 感受态细胞,在筛选培养基上进行蓝白斑筛选,取白斑培养,用 PCR 方法进行鉴定,引物为 M13F/M13R,目的片段长度为 3 500 bp。

A.3.3 转染及病毒鉴定

将鉴定正确的克隆菌在培养基中扩大培养,用质粒提取试剂盒提取重组杆粒 DNA,用转染试剂转染 Sf9 细胞,转染后 28 ℃ 培养 96 h,获得重组病毒。将病毒液在 Sf9 细胞上传 3 代后,以 1% 的比例感染 Sf9 细胞,28 ℃ 培养 96 h 后,收集培养上清。

A.3.4 猪瘟疫病毒 E2 蛋白的纯化

将收集的培养上清 12 000 r/m 离心 10 min,除去细胞碎片,然后将上清用离心超滤法浓缩;浓缩的上清在镍离子亲和层析洗液(50 mmol/L 磷酸钠,300 mmol/L 氯化钠,pH 7.0)中 4 ℃ 透析过夜。平衡过的上清加入洗液平衡过镍离子亲和层析柱,4 ℃ 吸附 30 min 后,用 40 mmol/L 咪唑洗脱,收集洗脱液。用 SDS-PAGE 电泳检测纯化效果。

A.3.5 蛋白浓度测定

用 BCA 法测定蛋白浓度,按说明书配制 BSA 蛋白标准 250 μg/mL、125 μg/mL、50 μg/mL、

25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0 $\mu\text{g}/\text{mL}$,将 E2 蛋白稀释 10 倍,其他均按说明书操作。测定 OD_{592 nm},绘制标准曲线,计算 E2 蛋白浓度。纯化后的 E2 蛋白浓度应 $\geq 0.1 \text{ mg}/\text{mL}$ 。

A.3.6 蛋白纯度测定和特异性测定

取 5 μL 、2 μL 、1 μL 纯化产物进行 SDS-PAGE 电泳,用凝胶成像仪中成像并用薄层扫描法测定蛋白纯度,蛋白纯度应 90%。同时用猪瘟阳性血清对纯化后的 E2 蛋白进行 Western blot 鉴定和 ELISA 鉴定,猪瘟阳性血清应仅与目的蛋白发生特异性反应,杂蛋白无反应。

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

附 录 B
(规范性附录)
试剂配制

B.1 包被液的配制

称取碳酸钠 1.0 g 和碳酸氢钠 3.0 g,溶于 1 000 mL 去离子水,调节 pH 值至 9.4~9.6。

B.2 磷酸盐缓冲液的配制

称取十二水合磷酸氢二钠 0.25 g、二水合磷酸二氢钠 3.5 g 和氯化钠 8.5 g,溶于 800 mL 去离子水中,调节 pH 值至 7.2~7.6,用去离子水定容至 1 000 mL。

B.3 封闭液的配制

称取牛血清白蛋白 3.0 g,溶于 100 mL 磷酸盐缓冲液中。

B.4 1×洗涤液的配制

先配制 20 倍浓缩洗液。称取十二水合磷酸氢二钠 5.0 g、二水合磷酸二氢钠 70.0 g,氯化钠 170.0 g,吐温-20 16.0 mL,加去离子水至 800 mL,调 pH 值至 7.4~7.6,定容至 1 000 mL。121 °C 15 min 高压灭菌后,室温存放备用。使用前,将 20 倍浓缩洗液用蒸馏水或去离子水按 1:19 的比例混合即可。

B.5 稀释液的配制

量取 5.0 mL 马血清溶于 95.0 mL 磷酸盐缓冲液中。

B.6 底物液 A 的配制

称取 TMB 200.0 mg,无水乙醇(或二甲基亚砜)100 mL,加双蒸水至 1 000 mL。

B.7 底物液 B 的配制

十二水合磷酸氢二钠 14.60 g,柠檬酸 9.33 g,0.75%过氧化脲 6.4 mL,加三蒸水至 1 000 mL,调 pH 值至 5.0~5.4。

B.8 终止液的配制

将去离子水与浓盐酸(36%~38%)以 9:1 的比例混合即可,室温保存。

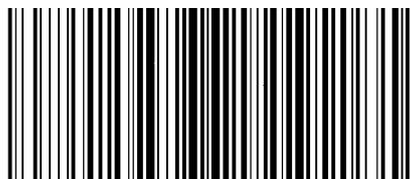
全国动物卫生标准化技术委员会 专用

 **版权声明**

中国标准在线服务网(www.spc.org.cn)是中国标准出版社委托北京标科网络技术有限公司负责运营销售正版标准资源的网络服务平台,本网站所有标准资源均已获得国内外相关版权方的合法授权。未经授权,严禁任何单位、组织及个人对标准文本进行复制、发行、销售、传播和翻译出版等违法行为。版权所有,违者必究!

中国标准在线服务网
<http://www.spc.org.cn>

标准号: GB/T 35906-2018
购买者: 全国动物卫生标准化技术委员会
订单号: 0100191211052085
防伪号: 2019-1211-0434-4808-7909
时 间: 2019-12-11
定 价: 21元



GB/T 35906-2018

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
猪瘟抗体间接 ELISA 检测方法
GB/T 35906—2018

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址: www.spc.org.cn

服务热线: 400-168-0010

2018年2月第一版

*

书号: 155066·1-59556

版权专有 侵权必究