



中华人民共和国国家标准

GB/T 34729—2017

猪瘟病毒阻断 ELISA 抗体检测方法

Blocking ELISA method to detect antibody against classical swine fever virus

2017-11-01 发布

2018-05-01 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

订购号: 0100191216052486 防伪编号: 2019-1216-0947-0052-1712 购买单位: 全国动物卫生标准化技术委员会

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 34729-2017
购买者: 全国动物卫生标准化技术委员会
订单号: 0100191216052486
防伪号: 2019-1216-0947-0052-1712
时 间: 2019-12-16
定 价: 21元

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
猪瘟病毒阻断 ELISA 抗体检测方法
GB/T 34729—2017

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
2017年11月第一版

书号: 155066·1-57910

版权专有 侵权必究

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、朱元源、邹兴启、宁宜宝。

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

引 言

本文件的发布机构提请注意,声明符合本文件时,可能涉及 4.1 与猪瘟病毒 E2 蛋白表达及纯化相关的专利的使用。

本文件的发布机构对于该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利持有人已向本文件的发布机构保证,他愿意同任何申请人在合理且无歧视的条款和条件下,就专利授权许可进行谈判。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案。相关信息可通过以下联系方式获得:

专利持有人姓名:中国兽医药品监察所

地址:北京中关村南大街 8 号

请注意除上述专利外,本文件的某些内容仍可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

猪瘟病毒阻断 ELISA 抗体检测方法

1 范围

本标准规定了猪瘟病毒抗体检测的阻断 ELISA 方法。
本标准适用于猪瘟抗体检测,但无法区分疫苗免疫抗体和野毒感染抗体。

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。

兽医实验室生物安全技术管理规范 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 酶结合物:参见附录 B。
- 4.3 标准阳性血清:猪瘟疫苗免疫仔猪制备,经荧光抗体病毒中和试验检测为阳性。
- 4.4 标准阴性血清:无母源抗体、未免疫猪瘟疫苗的仔猪血清,经荧光抗体病毒中和试验检测为阴性。
- 4.5 包被液:见 C.1。
- 4.6 磷酸盐缓冲液:见 C.2。
- 4.7 封闭液:见 C.3。
- 4.8 20 倍浓缩洗液:见 C.4。
- 4.9 稀释液:见 C.5。
- 4.10 底物液 A:见 C.6。
- 4.11 底物液 B:见 C.7。
- 4.11 终止液:见 C.8。
- 4.12 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 °C 温箱。

- 5.2 酶联读数仪。
- 5.3 微量移液器(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 一次性注射器(5 mL、10 mL)。

6 血清样本的处理

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,不同猪的注射器不能混用。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,待自然凝固后,置于 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

血清样本在一周内检测,可置 2 ℃~8 ℃条件下保存,超过一周,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 检测步骤

- 7.1 抗原包被:用包被液将亲和层析纯化的 E2 蛋白稀释至 0.2 μg/mL,包被酶联反应板,100 μL/孔,2 ℃~8 ℃包被 16 h,即为抗原包被板。
- 7.2 抗原包被板的封闭:包被结束后,弃去孔中液体,每孔加入 1×洗液 300 μL,漂洗 1 次。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 倍洗液 300 μL,漂洗 1 次,于吸水滤纸上拍干。
- 7.3 在抗原包被板中加入稀释液,50 μL/孔。将待检血清按顺序加入到抗原包被板中,50 μL/孔。同时加入阳性对照及阴性对照血清各 2 孔,50 μL/孔。37 ℃温箱中反应 1 h。
- 7.4 弃去反应液,每孔加入 1×洗液 300 μL,漂洗 3 次。
- 7.5 用稀释液将酶结合物稀释 100 倍,每孔加入 100 μL。37 ℃温箱中反应 1 h。
- 7.6 重复 7.4 步骤。
- 7.7 将底物液 A 和 B 按等体积进行混合,混合后立即加入到抗原包被板中,每孔 100 μL,避光显色 10 min。
- 7.8 每孔加入 100 μL 终止液。
- 7.9 酶标仪上读取 450 nm 吸光值。
- 7.10 结果计算[见式(1)~式(3)]:

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

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。

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

购买单位: 全国动物卫生标准化技术委员会
 订购编号: 2019-1216-0947-0052-1712
 防伪编号: 2019-1216-0947-0052-1712
 订单号: 0100191216052486

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。

$$B = \frac{\bar{N} - S}{\bar{N}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(3)$$

式中：

B ——阻断率；

\bar{N} ——阴性对照孔平均值；

S ——样本 OD 值。

7.11 试验成立条件：标准阴性对照血清 $OD_{450\text{ nm}} \geq 0.5$ ，标准阳性对照的阻断率大于 50%，该检验结果成立。若试验不成立，应进行重复检测。

8 结果判定

8.1 如果被检样本的阻断率 $\geq 40\%$ ，则该样本可以判为阳性，即有猪瘟抗体存在；如被检样本的阻断率 $\leq 32\%$ ，则该样本可以判为阴性，即无猪瘟抗体存在；如果该样本的阻断率在 $32\% \sim 40\%$ ，则应在 14 d 后对动物进行重新检测。

8.2 若采用商品化试剂盒，可根据说明书进行操作及结果判定。

9 注意事项

9.1 所有操作应严格遵守生物安全规定。

9.2 用于加样的移液器应进行校准，以免误差过大影响检测结果。

9.3 20 倍浓缩洗涤液在低温保存时可能会产生白色结晶，应加热使其溶解后再使用。

9.4 底物溶液和终止液对眼睛、皮肤以及呼吸道有刺激作用，使用过程中应穿戴相应的防护用具，防止接触和吸入。

9.5 底物溶液应避光保存，避免与氧化剂接触，盛装底物溶液的容器应保持干净。

9.6 所有试剂一律于 $2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存，使用前恢复至室温。

9.7 血清稀释板只能使用一次，没用完的血清稀释板应将用过的孔充分洗涤拍干，并进行标记，避免下次检测时发生混淆。在进行多板检测时，反应板不能叠放在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温箱中，以免导致各反应板受热不均。 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应时，反应板可平放于湿盒内或加封板膜后直接平放于温箱中，但不能采用密封袋，以免导致受热不均。

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

订购单位：全国动物卫生标准化技术委员会
订购编号：2019-1216-0947-0052-1712
防伪编号：2019-1216-0947-0052-1712
订购编号：0100191216052486

附录 A

(规范性附录)

猪瘟疫毒 E2 蛋白的表达及纯化

A.1 材料和试剂

猪瘟疫免化弱毒疫苗株;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
 AGTTGTTCTGTTAGAACTACGTAGGTCACCTATCAGC<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

猪瘟疫免化弱毒疫苗株 RNA 的提取、反转录合成病毒 cDNA。再用引物 P1-1 和 P2-1 扩增猪瘟疫免化弱毒疫苗株基因,琼脂糖凝胶纯化,将纯化产物和载体 pFastbac1 分别用 BamH I /Hind III 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
(资料性附录)
酶结合物的制备

B.1 材料

B.1.1 猪痘病毒 E2 蛋白:制备及纯化见附录 A。

B.1.2 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、6~8 周龄 Bal B/C 小鼠、青链霉素混合液(100 x)、小鼠骨髓瘤细胞(SP2/0)、改良 Eagle 培养基(Dulbecco's modification of Eagle's medium Dulbecco, DMEM)、胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)、50% 聚乙二醇 1 000、次黄嘌呤-氨喋呤-胸苷培养基添加物(50×)(HYPOXANTHINE-THYMIDINE MEDIA SUPPLEMENT, HT)、次黄嘌呤-氨喋呤-胸苷培养基添加物(50×)(HYPOXANTHINE-AMINOPTERIN-THYMIDINE MEDIA SUPPLEMENT, HAT)、蛋白 G 亲和层析柱,辣根过氧化物酶标记试剂盒,细胞培养板、细胞培养瓶等均为商品化产品。

B.1.3 基础培养液:DMEM 培养基,含 1%青链霉素混合液。

B.1.4 HAT 培养液:含 10%FBS 的 DMEM 培养液,加 HAT 至终浓度为 2%,含 1%青链霉素混合液。

B.1.5 HT 培养液:含 10%FBS 的 DMEM 培养液,加 HT 至终浓度为 2%,含 1%青链霉素混合液。

B.2 方法

B.2.1 免疫

首免:将猪痘病毒 E2 蛋白稀释至 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,与弗氏完全佐剂等量混合,颈背部皮下多点注射,1 mL/只;二免:4~6 周后,将浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 E2 蛋白与弗氏不完全佐剂等量混合,腹腔注射,0.5 mL/只;三免:方法同二免;四免:三免 2 周后,取 0.5 mL 浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 E2 蛋白直接腹腔免疫小鼠。3 d 后进行细胞融合。

B.2.2 细胞融合

无菌摘取免疫小鼠脾脏,磨碎后,分别用 150 μm 和 200 μm 铜网过滤,将收集的细胞用 1 000 r/min 离心 5 min。弃上清,沉淀用无血清 DMEM 重悬,进行细胞计数。将培养好的 SP2/0 细胞从细胞培养瓶上轻轻吹下,用无血清 DMEM 培养液重悬,进行细胞计数。将制备的脾细胞和 SP2/0 细胞按照 5:1~8:1 的比例混合,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清。吸取 1 mL 50% 聚乙二醇 1 000 溶液,缓慢加入(60 s 内)至细胞中。然后立即在 5 min 内滴加 25 mL 无血清 DMEM。1 000 r/min 离心 10 min,弃上清,加入 30 mL HAT 培养液重悬,分装于 96 孔细胞培养板中,置含 5%二氧化碳 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中培养 7 d。

B.2.3 抗体检测及筛选

定期观察融合后细胞,待细胞培养液上清变黄或克隆分布至孔底面积的 1/10 以上时,吸取 100 μL 细胞上清进行抗体检测。采用有限稀释法对阳性克隆孔进行亚克隆,所有操作采用 HT 培养液进行。置含 5%二氧化碳的 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中培养,定期观察,采用相同方法进行抗体检测。亚克隆过程应进行 3 次~4 次。

B.2.4 单克隆抗体腹水的制备与纯化

将筛选的杂交瘤细胞进行扩大培养后,收集细胞,进行计数,将细胞浓度调整至 1×10^6 细胞/mL ~ 2×10^6 细胞/mL,每只老鼠腹腔接种 0.5 mL。定期观察,待小鼠腹部膨大且有波动感时,用注射器吸取腹水。将采集的腹水于 5 000 r/min 离心 10 min,取上清,用 0.01 mol/L pH 7.2 的磷酸盐缓冲液将腹水稀释 10 倍,用蛋白 G 亲和层析柱进行纯化。

B.2.5 酶结合物的制备

将纯化后的单克隆抗体用辣根过氧化物酶标记试剂盒进行标记,操作步骤按照说明书进行。

B.2.6 酶结合物效价的确定

将酶结合物进行 100 倍稀释后,再进行 2 倍梯度稀释。用 7.2 中制备的抗原包被板进行酶结合物效价测定,将 OD 值最接近 1.0 的稀释度作为酶结合物效价。调整酶结合物浓度至终效价的 100 倍, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 分装备用。

全国动物卫生标准化技术委员会

附 录 C
(规范性附录)
试 剂 配 制

C.1 包被液的配制

称取碳酸钠 1 g 和碳酸氢钠 3 g,溶于 1 000 mL 去离子水,调节 pH 至 9.4~9.6。

C.2 磷酸盐缓冲液的配制

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

C.3 封闭液的配制

称取牛血清白蛋白 3 g,溶于 100 mL 磷酸盐缓冲液中。

C.4 20 倍浓缩洗液的配制

称取十二水合磷酸氢二钠 70 g,二水合磷酸二氢钠 5 g,氯化钠 170.0 g,吐温-20 16.0 mL,加去离子水至 800 mL,调 pH 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。

C.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。

C.6 底物液 A 的配制

称取 TMB 200 mg,无水乙醇(或二甲基亚砜)100 mL,加双蒸水至 1 000 mL。

C.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,调至 pH 5.0~5.4。

C.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。

