



中华人民共和国国家标准

GB/T 35910—2018

猪圆环病毒 2 型阻断 ELISA 抗体检测方法

Blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detecting
the antibody to porcine circovirus type 2

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: 0100200414058729 防伪编号: 2020-0414-0921-4983-3376 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:南京农业大学。
本标准起草人:姜平、王先炜、白娟、杨香林、刘捷。

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

订单号: 0100200414058729 防伪编号: 2020-0414-0921-4983-3376 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

猪圆环病毒 2 型阻断 ELISA 抗体检测方法

1 范围

本标准规定了猪圆环病毒 2 型抗体阻断 ELISA 的检测方法。

本标准适用于猪圆环病毒病的抗体检测、疫苗免疫抗体监测和血清流行病学调查。

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 19489 实验室 生物安全通用要求

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

SN/T 2984 检验检疫动物病原微生物实验活动生物安全要求细则

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BSA:牛血清白蛋白(Bovine serum albumin)

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

HRP:辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase)

PCV2:猪圆环病毒 2 型(Porcine circovirus type 2)

TMB:四甲基联苯胺(Tetramethylbenzidine)

4 仪器、材料与试剂

4.1 试验仪器

4.1.1 酶联免疫检测仪。

4.1.2 高速台式冷冻离心机。

4.1.3 微量移液器:规格 0.5 μL ~10 μL 、20 μL ~200 μL 、100 μL ~1 000 μL 。

4.1.4 12 道可调微量移液器:规格 10 μL ~100 μL 。

4.2 试验材料

4.2.1 96 孔酶标反应板。

4.2.2 注射器(5 mL)。

4.2.3 微量离心管(1.5 mL)。

4.2.4 吸头(可与移液器配套)。

4.3 主要试剂

- 4.3.1 PCV2 重组核衣壳蛋白(Cap)抗原(见附录 A)。
- 4.3.2 辣根过氧化物酶(HRP)标记的 PCV2 单克隆抗体。
- 4.3.3 PCV2 阳性对照血清和阴性对照血清(见附录 A)。
- 4.3.4 四甲基联苯胺(TMB)(见附录 B)。
- 4.3.5 商品化 PCV2 ELISA 抗体检测试剂盒。

5 PCV2 抗体阻断 ELISA 检测方法

5.1 样品采集、运输与保存处理

5.1.1 基本要求

按 NY/T 541 采集猪血液,按 SN/T 2984 处理待检猪。另外,按 GB 19489 进行检测。

5.1.2 样品采集与运送

采用消毒注射器经猪颈静脉采集血液 2 mL,凝固后 24 h 内在冷藏条件下送到实验室。若不能及时送往实验室,则应分离血清,放入无菌微量离心管中置 -20 °C 保存,并在冻结状态下送往实验室。

5.1.3 血清分离与保存

取凝固血液,2 000 r/min 离心 5 min,收集上清,放入无菌微量离心管中,立即用于抗体检测,或置 -20 °C 保存。要求血清清亮,无溶血。

5.2 ELISA 操作步骤

5.2.1 抗原包被板的制备:

- a) 抗原包被:用抗原包被液(见 B.1)将 PCV2 Cap 蛋白(见 A.1)稀释成 2.0 μg/mL,加入 96 孔酶标反应板,每孔 100 μL,置 37 °C 2 h;
- b) 洗涤:倾去孔中液体,用 PBST 洗涤液(见 B.5)洗涤,每孔 300 μL,洗涤 3 次,每次 3 min,最后一次拍干;
- c) 封闭:每孔加入 200 μL 1%BSA(牛血清白蛋白)封闭液(见 B.2),置 37 °C 下孵育 3 h;
- d) 加保护剂:弃去孔中液体,按 5.2.1 b)洗涤 3 次,加入抗原保护剂(见 B.3),100 μL/孔,置 37 °C 下作用 1 h;
- e) 密封:置 37 °C 晾干,用锡箔纸真空包装,密封。

5.2.2 血清样品稀释和加样:

取出抗原包被板并在记录表(表 1)上标记待检样品($YP_1 \sim YP_n$)的位置。用血清稀释液(见 B.4)在稀释板内将待检血清 1:1 稀释,即每孔先加 50 μL 样品稀释液,再加 50 μL 待检血清,混匀后,按记录表中标记的对应于抗原包被板上的位序,依次加入到 YP_1 、 YP_2 、 YP_3 、……等位置的各孔中。吸取每份血清时均应更换吸头。

待检血清样品数量较多时(≥ 10 份),应先使用血清稀释板稀释所有待检血清,再将稀释好的血清转移到抗原包被板,以尽可能使反应时间一致。

表 1 样品加样记录表(推荐模式)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	—	—	YP ₁₃	YP ₂₁	YP ₂₉							
B	+	+	YP ₁₄	YP ₂₂	YP ₃₀							
C	YP ₁	YP ₇	YP ₁₅	YP ₂₃	YP ₃₁							
D	YP ₂	YP ₈	YP ₁₆	YP ₂₄	YP ₃₂							
E	YP ₃	YP ₉	YP ₁₇	YP ₂₅	YP ₃₃							
F	YP ₄	YP ₁₀	YP ₁₈	YP ₂₆	YP ₃₄							
G	YP ₅	YP ₁₁	YP ₁₉	YP ₂₇	YP ₃₅							
H	YP ₆	YP ₁₂	YP ₂₀	YP ₂₈	YP ₃₆							

注：—为阴性对照；+为阳性对照；YP₁为样品1，其余类推。

5.2.3 加对照血清：用血清稀释液(见 B.4)将阳性对照血清(见 A.2.1)、阴性对照血清(见 A.2.2)分别做 1:1 稀释后，各取 100 μL 阴性对照血清分别加入 A1 孔和 A2 孔，各取 100 μL 阳性对照血清分别加入 B1 孔和 B2 孔。吸取不同血清时需要更换吸头。

5.2.4 混合孵育：轻轻振荡微量反应板(孔中样品勿溢出)，用封条封闭，置 37 °C 下孵育 2 h。

5.2.5 洗涤：同 5.2.1 b)。

5.2.6 加酶标单抗和孵育：每孔加入 100 μL 工作浓度的 HRP 标记的 PCV2 单克隆抗体，37 °C 孵育 30 min。该试剂使用前恢复到室温，使用后放回 2 °C~8 °C。

5.2.7 洗涤：同 5.2.1 b)。

5.2.8 显色：每孔加入 100 μL TMB 底物液显示液(见 B.6)，37 °C 避光孵育 10 min~15 min，至阴性对照显蓝色、阳性对照基本不显色时，每孔加入 50 μL 终止液(见 B.7)。

5.2.9 在酶联免疫检测仪 450 nm 波长处读取各孔的 OD 值数，15 min 内完成。

5.3 结果判定

5.3.1 结果计算

阴性对照平均 OD 值(NC_x)见式(1)：

$$NC_x = (A1 \text{ 孔 OD 值} + A2 \text{ 孔 OD 值}) / 2 \quad \dots\dots\dots (1)$$

阳性对照平均 OD 值(PC_x)见式(2)：

$$PC_x = (B1 \text{ 孔 OD 值} + B2 \text{ 孔 OD 值}) / 2 \quad \dots\dots\dots (2)$$

样品阻断率的计算见式(3)：

$$\text{阻断率(PI)} = (NC_x - \text{样品 OD 值}) / NC_x \times 100\% \quad \dots\dots\dots (3)$$

5.3.2 判定

NC_x 大于 0.7, PC_x 小于 0.4 时，试验条件成立。当 PI ≥ 38% 判为阳性，PI ≤ 30% 判为阴性，30% < PI < 38% 判为可疑，对可疑样品重新检测一次，PI < 38%，判为阴性。

或使用商品化 PCV2 ELISA 抗体检测试剂盒，其操作和判定按其说明书进行。

附 录 A
(规范性附录)
抗原抗体的制备

A.1 重组 Cap 抗原制备

A.1.1 菌种

表达抗原蛋白的菌种为 BL21-CapC,由含 PCV2 Cap 第 51~234aa 基因原核表达质粒 pET-CapC 转化大肠杆菌 BL21(DE3)获得。

A.1.2 菌液培养

取 BL21-CapC 种子液按培养基体积 1% 量接种于含卡那霉素的 LB 液体培养基中,200 r/min,37 °C 摇床振荡培养 1.5 h~2 h,菌液浓度 OD_{600 nm} 值达到 0.6~0.8 时,加入 IPTG 至终浓度 1.0 mmol/L,37 °C 振荡培养 6 h。

A.1.3 菌体裂解与包涵体蛋白提取

将 A.1.2 收集的细菌样品 4 °C 8 000 r/min 离心 5 min,PBS 缓冲液(0.01 mol/L,pH 7.2)重悬,如此洗涤 2 次;弃上清,用适量 PBS 重悬细菌沉淀,并反复冻融 3 次;在功率 200 W 的条件下超声波裂解细菌,超声裂解 5 s,停顿 5 s,直至菌液变得清澈,在冰盒上操作;将上述裂解物 4 °C 8 000 r/min 离心 10 min,沉淀用与上清等体积的 PBS 重悬,8 000 r/min 离心 15 min,用包涵体洗液 I(见 B.8)重悬沉淀,4 °C 2 h,重复 1 次;8 000 r/min 离心 15 min,包涵体洗液 II(见 B.9)重悬沉淀,4 °C 2 h,重复 1 次;8 000 r/min 离心 15 min,用 8 mol/L 尿素重悬沉淀,4 °C 放置 12 h~24 h;8 000 r/min 离心 15 min,吸取上清(即纯化后的蛋白)至微量离心管,分光光度计测定蛋白浓度,分装,-20 °C 保存。

A.1.4 重组抗原质量检验

A.1.4.1 抗原纯度鉴定

取 A.1.3 收集的样品,加入 25 μL 的 5×蛋白样品上样缓冲液,充分混匀后 100 °C 煮沸 5 min,立即置冰上 1 min~2 min,上样前瞬时离心,吸取上清,用 12% 的丙烯酰胺 SDS-PAGE 分析,在 41 kDa 处出现一条清晰条带,抗原纯度达 90% 以上。

A.1.4.2 蛋白抗原性鉴定

取上述收集的样品 20 μL,按 A.1.4.1 方法进行 SDS-PAGE 电泳。然后 25 V 恒压下,转印 45 min,使目的条带转印至 NC 膜上。用 PBST 洗涤液(见 B.5)配制的 5% 的脱脂乳封闭 2 h,PBST 洗涤后,加适量稀释的 PCV2 Cap 单克隆抗体,作用 1 h,PBST 洗涤,再加 1:20 000 稀释的羊抗鼠 IgG-HRP 作用 1 h,洗涤后加显色液于暗室曝光,应在 41 kDa 处出现单一清晰条带,且无其他杂带。

A.1.4.3 抗原浓度的测定

用紫外分光光度计分别测定包被抗原在 280 nm 和 260 nm 波长时的光吸收值(OD),按公式 $1.45 \times OD_{280 \text{ nm}} - 0.74 \times OD_{260 \text{ nm}}$ 计算抗原浓度,浓度不低于 0.5 mg/mL。

A.1.4.4 抗原免疫学活性鉴定

采用 ELISA 方法测定。用抗原包被液将纯化的蛋白从 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 稀释至 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 包被 ELISA 酶标板, 进行 ELISA 检测。选择阳性对照血清的 S/P 值高于阳性判定标准时的抗原最高稀释倍数作为抗原包被浓度。抗原效价应大于 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

A.1.5 分装及保存

将检测合格的抗原分装到 1.5 mL 微量离心管中, 分装量为 1 mL/管, 置 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存, 有效期为 12 个月。避免反复冻融和污染。

A.2 PCV2 阴性和阳性对照血清制备

A.2.1 阳性对照血清

A.2.1.1 血清来源动物

4 周龄~6 周龄健康仔猪(ELISA 检测血清中 PCV2 抗体阴性, PCR 检测 PCV2 阴性), 隔离观察 7 d。

A.2.1.2 免疫接种

取 PCV2 SH 株($\text{TCID}_{50} \geq 10^{6.0}/\text{mL}$)病毒液, 颈部肌肉注射 2 mL/头, 间隔 28 d 用相同剂量 PCV2 再次肌注接种, 第二次接种后 20 d~40 d 采血分离血清, 用 PCV2 间接免疫荧光试验检测 PCV2 抗体, 抗体效价大于 1:64 时, 即可用于采血并分离血清。

A.2.1.3 血清制备

采取颈部动脉采血方式, 无菌采集血液, 离心分离血清, 用 0.45 μm 滤膜过滤除菌。用 PCV2 间接免疫荧光试验检测 PCV2 抗体, 应为阳性。用阻断 ELISA 方法检测 PCV2 ELISA 抗体, 阻断率均应大于 60%, $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值均应低于 0.4。

A.2.1.4 血清保存

置 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存, 避免反复冻融和污染, 有效期 24 个月。

A.2.2 阴性对照血清

A.2.2.1 血清来源动物

同 A.2.1.1。

A.2.2.2 血清制备

采取颈部动脉采血方式, 无菌采集血液, 离心分离血清, 用 0.45 μm 滤膜过滤除菌。用 PCV2 间接免疫荧光试验检测 PCV2 抗体, 应为阴性。阻断 ELISA 方法检测阻断率均低于 30%, $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值均应大于 0.7。

A.2.2.3 血清保存

同 A.2.1.4。

附录 B
(规范性附录)
溶液的配制

B.1 抗原包被液(pH 9.6, 0.05 mol/L)

称取 Na_2CO_3 1.59 g、 NaHCO_3 2.93 g, 加去离子水 800 mL, 用 1 mol/L 的 NaOH 和 1 mol/L 的 HCl 调 pH 值至 9.6, 加去离子水定容至 1 000 mL。

B.2 封闭液

称取 BSA 1 g, 溶解于 100 mL PBST 洗涤液中, 0.22 μm 滤膜过滤, 分装后 4 $^\circ\text{C}$ 保存。

B.3 保护剂

称取 BSA 0.5 g、蔗糖 2 g, 加去离子水溶解并定容至 100 mL, 0.22 μm 滤膜过滤, 分装后 2 $^\circ\text{C}$ ~8 $^\circ\text{C}$ 备用。

B.4 样品稀释液

取 NaCl 8 g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.9 g、KCl 0.2 g 和 Tween-20 0.5 mL, 溶于灭菌去离子水中, 定容至 1 000 mL, 0.22 μm 滤膜过滤, 分装, 20 mL/瓶。2 $^\circ\text{C}$ ~8 $^\circ\text{C}$ 下保存。

B.5 10 倍浓缩洗涤液

取 NaCl 80 g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2 g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 29 g、KCl 2 g、Tween-20 5 mL, 加入灭菌去离子水充分溶解, 定容至 1 000 mL, 0.22 μm 滤膜过滤, 分装, 80 mL/瓶。2 $^\circ\text{C}$ ~8 $^\circ\text{C}$ 下保存。

PBST 洗涤液配制: 将 10 倍浓缩洗涤液恢复至室温, 并摇动使沉淀溶解(或于 37 $^\circ\text{C}$ 水浴锅中加热 5 min~10 min), 然后用去离子水作 10 倍稀释, 混匀, 稀释好的洗涤液在 2 $^\circ\text{C}$ ~8 $^\circ\text{C}$ 可以存放 7 d。

B.6 显色液

A 液配制: 取 Na_2HPO_4 14.6 g、柠檬酸 9.33 g、30% H_2O_2 2 mL, 加双蒸水至 1 000 mL, 调 pH 至 5.2。

B 液配制: 取四甲基联苯胺(TMB) 20 mg、无水乙醇 10 mL, 加双蒸水至 1 000 mL。

使用前将 A 液和 B 液等量混合, 分装于棕色瓶内, 20 mL/瓶, 2 $^\circ\text{C}$ ~8 $^\circ\text{C}$ 下避光保存。

B.7 终止液(2 mol/L H_2SO_4)

取去离子水 177.8 mL, 缓慢加入 H_2SO_4 (96%) 22.2 mL, 分装, 10 mL/瓶, 2 $^\circ\text{C}$ ~8 $^\circ\text{C}$ 下保存。


B.8 包涵体洗液 I (pH 8.0)

取 Tris · HCl 6 g、NaCl 5.8 g、EDTA 2.92 g、Triton X-100 10 mL,用去离子水加至 1 L。

B.9 包涵体洗液 II (pH 8.0)

取 Tris · HCl 6 g、NaCl 5.8 g、EDTA 2.92 g、Triton X-100 5 mL,用去离子水加至 1 L。

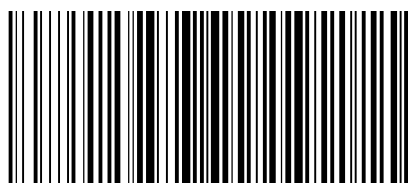
全国动物卫生标准化技术委员会 专用

 **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 35910-2018
购买者: 全国动物卫生标准化技术委员会
订单号: 0100200414058729
防伪号: 2020-0414-0921-4983-3376
时 间: 2020-04-14
定 价: 21元



GB/T 35910-2018

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
**猪圆环病毒 2 型阻断 ELISA
抗体检测方法**

GB/T 35910—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 · 1-59552

版权专有 侵权必究