

# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T 3468—2019

---

## 猪轮状病毒间接ELISA 抗体检测方法

Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detection of  
antibodies against porcine rotavirus

2019-08-01 发布

2019-11-01 实施

---



中华人民共和国农业农村部 发布

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由农业农村部畜牧兽医局提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAT/TC 181)归口。

本标准起草单位:东北农业大学、中国动物卫生与流行病学中心。

本标准起草人:王丽、乔薪媛、李一经、邵卫星、姜艳平、魏荣、王岩、李晓成、唐丽杰、崔文、孙映雪、吴发兴。

## 猪轮状病毒间接 ELISA 抗体检测方法

### 1 范围

本标准规定了猪轮状病毒间接 ELISA 抗体检测方法的试剂、仪器和设备、试验程序、试验结果的判定方法以及注意事项。

本标准适用于猪轮状病毒抗体检测,用于猪轮状病毒感染的流行病学调查和分析。

### 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

GB/T 27401 实验室质量控制规范 动物检疫

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

中华人民共和国农业部公告第 302 号 兽医实验室生物安全技术管理规范

### 3 设备和器材

#### 3.1 酶标测定仪

#### 3.2 恒温培养箱

#### 3.3 冰箱(4℃、-20℃)

#### 3.4 离心机

#### 3.5 微量移液器

量程:20  $\mu\text{L}$ ~200  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$ ~1 000  $\mu\text{L}$ 。

#### 3.6 酶标板

#### 3.7 一次性注射器

量程:5 mL。

### 4 试剂

#### 4.1 猪轮状病毒 VP6 蛋白

VP6 蛋白的表达与纯化见附录 A。

#### 4.2 标准阳性血清

猪轮状病毒疫苗免疫仔猪制备,血清经病毒中和试验检测为阳性。

#### 4.3 标准阴性血清

无母源抗体、未免疫猪轮状病毒疫苗的 15 日龄~30 日龄仔猪血清。血清经病毒中和试验检测,中和效价不大于 1:4。

#### 4.4 包被液

配制见附录中的 B.1。

#### 4.5 磷酸盐缓冲液(PBS 液)

配制见 B.2。

#### 4.6 洗涤液

配制见 B.3。

#### 4.7 封闭液

配制见 B. 4。

#### 4.8 血清稀释液

配制见 B. 5。

#### 4.9 底物显色液

配制见 B. 6。

#### 4.10 终止液

配制见 B. 7。

#### 4.11 辣根过氧化物酶标记的山羊抗猪 IgG、脱脂乳、TMB 等

均为商品化试剂。

### 5 血清样本的处理

按照 NY/T 541 的规定进行血清样本的采集、处理、保存和运输,并按照中华人民共和国农业部公告第 302 号的要求进行样品的生物安全标识。

### 6 间接 ELISA 抗体检测操作方法

#### 6.1 包被抗原

将纯化的 VP6 蛋白用包被液稀释至  $3\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ,每孔  $100\ \mu\text{L}$ ,包被酶标板,封口后, $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 包被 12 h。包被结束后,弃去包被液,每孔加入  $250\ \mu\text{L}$  洗涤液,振荡洗涤 3 次,每次 5 min。

#### 6.2 封闭

每孔加入封闭液  $250\ \mu\text{L}$ ,置于  $37^{\circ}\text{C}$  恒温箱封闭 2 h。封闭结束后,弃去板中封闭液,每孔加入洗涤液  $250\ \mu\text{L}$ ,振荡洗涤 3 次,每次 5 min,于吸水滤纸上拍干后,置于  $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$  保存备用。

#### 6.3 加样

将待检血清用稀释液作  $1:100$  稀释,每孔加入  $100\ \mu\text{L}$ ,同时加入阴性对照和阳性对照血清各 2 孔, $100\ \mu\text{L}/\text{孔}$ 。置于  $37^{\circ}\text{C}$  培养箱中反应 1 h,洗板同上。

#### 6.4 加酶标抗体

将山羊抗猪酶标抗体用抗体稀释液稀释至工作浓度,每孔加入  $100\ \mu\text{L}$ ,置于  $37^{\circ}\text{C}$  培养箱中反应 1 h,洗板同上。

#### 6.5 显色

每孔加入  $100\ \mu\text{L}$  底物显色液,轻轻摇匀, $37^{\circ}\text{C}$  避光显色 10 min。

#### 6.6 终止反应

每孔加入  $100\ \mu\text{L}$  终止液终止反应。

#### 6.7 读数

在酶标仪上读取  $450\ \text{nm}$  吸光值( $\text{OD}_{450}$ )。

### 7 试验结果的判定

#### 7.1 试验成立条件

在酶标测定仪上检测各孔光吸收值( $\text{OD}_{450}$ ),计算阳性对照平均  $\text{OD}_{450}$  和阴性对照平均  $\text{OD}_{450}$ 。阳性对照血清平均  $\text{OD}_{450} > 0.6$ ,阴性对照血清平均  $\text{OD}_{450} < 0.16$ ,试验成立。

#### 7.2 结果判定

计算待测样品孔平均  $\text{OD}_{450}$  和阴性对照孔平均  $\text{OD}_{450}$  之比。当样品孔平均  $\text{OD}_{450}(P)$  与阴性对照平均  $\text{OD}_{450}(N)$  之比不小于 2.0(即  $P/N \geq 2.0$ )时,判定为猪轮状病毒抗体阳性;当样品孔平均  $\text{OD}_{450}(P)$  与阴性对照平均  $\text{OD}_{450}(N)$  之比小于 2.0(即  $P/N < 2.0$ )时,判定为猪轮状病毒抗体阴性。

### 8 注意事项

#### 8.1 所有操作应严格按照 GB 19489 和 GB/T 27401 的规定进行。

- 8.2 所有试剂需在 2℃~8℃保存,使用前恢复至室温。
- 8.3 操作时,注意取样或稀释准确,移液器应进行校准,并注意更换吸头。
- 8.4 底物溶液和终止液对眼睛、皮肤及呼吸道有刺激性作用,使用过程应注意防护,防止直接接触和吸入。
- 8.5 底物溶液应避光保存,避免与氧化剂接触。



## 附录 A

## (规范性附录)

## 猪轮状病毒 VP6 蛋白的表达与纯化

## A.1 材料和试剂

猪轮状病毒;大肠杆菌 TG1 和 BL21(DE3)、pMD18-T 克隆载体、pET-30a 表达载体、RNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒、反转录试剂盒、胶回收试剂盒、限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶、镍离子亲和层析柱、MA104 细胞、LB 培养基、异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、BCA 试剂盒均为商品化试剂,PBS 缓冲液。

## A.2 猪轮状病毒 VP6 氨基酸参考序列

MEVLYSLSKTLKDARDKIVEGTLYSNISDLIQQFNQMIVTMNGNDFQTGGIGNLPIRNWNFD  
FGLLGTTLNIDANYVENARTTIEYFIDFIDNVCMDEMARESQRNGIAPQSEALRKLSGIKFKGIN  
FDNSSDYIENWNLQNRRTGFVVFHKNILPYSASFNLSRQPAHDNLMGTMWINAGSEIQVAG  
FDYSCAFNAPANIQQFEHVVPLRRALTTATITLLPDAERFSFPRVINSADGATTWYFNPVIIRPSN  
VEVEFLLNGQIINTYQARFGTIIARNFDTIRLSFQLVRPPNMTPAVANLFPQAPPFIFHATVGLTL  
RIESAVCESVLADASETLLANVTAVRQEYAIIPVGPVFPFGMNWTELITNYSRPNLQRVFTVA  
SIRSMLIK

## A.3 引物序列

VP6-F:5'-GGCTTTTAAACGAAGTCTTC-3';

VP6-R:5'-GGTCACATCCTCTCACTA-3'。

## A.4 方法

## A.4.1 VP6 蛋白重组原核表达载体的构建

利用 RNA 提取试剂盒提取猪轮状病毒的 RNA,并反转录成病毒的 cDNA,用引物 VP6-F 和 VP6-R 扩增 VP6 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 1 350 bp。纯化产物连接 pMD18-T 克隆载体,转化 TG1 感受态细胞,筛选获得重组阳性载体命名为 pMD18-T-VP6。用 Bam HI 和 Hind III 双酶切 pMD18-T-VP6 和 pET-30a,将 VP6 基因片段连接到 pET-30a 表达载体,转化 TG1 感受态细胞,筛选获得阳性重组载体命名为 pET-30a-VP6。

## A.4.2 VP6 蛋白的表达与纯化

将 pET-30a-VP6 转化 BL21(DE3)感受态细胞,筛选获得含有重组载体的阳性菌株。将阳性重组菌接种至 20 mL 含有 10  $\mu$ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养,待菌液 OD 值达到 0.5 左右,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,37 $^{\circ}$ C 振荡培养 4 h。4 000 r/min 离心收集菌体,PBS 重悬,超声裂解,12 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,取上清液。按照镍离子亲和层析柱的说明书纯化 VP6 蛋白,目的蛋白大小约为 45 ku。

## A.4.3 重组蛋白纯度及浓度测定

分别取 5  $\mu$ L、2.5  $\mu$ L 和 1  $\mu$ L 纯化的重组蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,用凝胶成像仪成像并用薄层扫描法测定蛋白纯度,蛋白纯度应不小于 90%。同时利用 BCA 法测定蛋白浓度,纯化后蛋白浓度应不小于 0.1 mg/mL。



**附录 B**  
**(规范性附录)**  
**溶液配制**

**B.1 包被液(0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液,pH 9.6)**

碳酸钠( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,分析纯)	1.59 g
碳酸氢钠( $\text{NaHCO}_3$ ,分析纯)	2.93 g
纯化水	加至 1 000 mL
溶解后,调节 pH 至 9.6,4℃保存备用。	

**B.2 PBS液(0.01 mol/L PBS,pH 7.4)**

磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,分析纯)	0.2 g
磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ,分析纯)	2.9 g
氯化钠( $\text{NaCl}$ ,分析纯)	8.0 g
氯化钾( $\text{KCl}$ ,分析纯)	0.2 g
纯化水	加至 1 000 mL
溶解后,调节 pH 至 7.4,保存于 4℃备用。	

**B.3 洗涤液(含 0.01 mol/L PBS-0.05% 吐温-20,PBST,pH 7.4)**

PBS	1 000 mL
吐温-20(分析纯)	0.5 mL
混匀后,调节 pH 至 7.4,现用现配。	

**B.4 封闭液**

脱脂乳 5 g,加 PBST 定容至 100 mL,现用现配。

**B.5 血清稀释液**

同 B.4 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
蒸馏水	加至 1 000 mL

**B.6.2 底物缓冲液 B**

磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ,分析纯)	71.7 g
柠檬酸(分析纯)	9.33 g
0.75%过氧化氢尿素	6.4 mL
蒸馏水	加至 1 000 mL,pH 调至 5.0~5.4。

**B.6.3 将底物 A 液和底物缓冲液按 1:1 混合,即成底物显色液,现用现配。**

**B.7 终止液(2 mol/L 硫酸溶液)**

硫酸(分析纯)	58 mL
蒸馏水	442 mL

---



中华人民共和国  
农业行业标准  
猪轮状病毒间接 ELISA 抗体检测方法  
NY/T 3468—2019

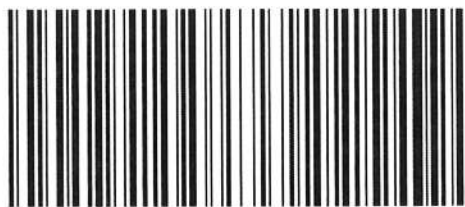
\* \* \*

中国农业出版社出版  
(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)  
(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)

北京印刷一厂印刷  
新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

\* \* \*

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 0.75 字数 15 千字  
2019 年 10 月第 1 版 2019 年 10 月北京第 1 次印刷  
书号: 16109·4888  
定价: 18.00 元



NY/T 3468—2019

版权专有 侵权必究  
举报电话: (010) 59194261