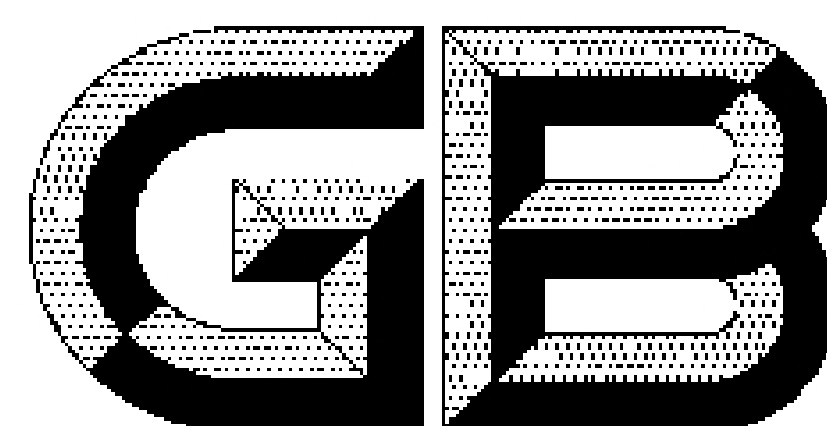




中华人民共和国国家标准

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 发布
中国国家标准化管理委员会

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。



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 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存,超过一周,应置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$,包被酶联反应板,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 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 $\times$ 洗液 300 μL ,漂洗 1 次。每孔加入新鲜配制的封闭液 300 μL , 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 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 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 。将待检血清按顺序加入到抗原包被板中,50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 。同时加入阳性对照及阴性对照血清各 2 孔,50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 。37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中反应 1 h。
- 7.4 弃去反应液,每孔加入 1 $\times$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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。

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

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。

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

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。

附 录 A
(规范性附录)
猪瘟病毒 E2 蛋白的表达及纯化

A.1 材料和试剂

猪瘟兔化弱毒疫苗株；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'>ATAGGATCCACCATGGCATTCCTCATCTGCTTGATAAAAGTATTAAG<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

猪瘟兔化弱毒疫苗株 RNA 的提取、反转录合成病毒 cDNA。再用引物 P1-1 和 P2-1 扩增猪瘟兔化弱毒疫苗株基因，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 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、0 $\mu\text{g/mL}$ ，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 $\geq 0.1 \text{ mg/mL}$ 。

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。

附 录 B
(资料性附录)
酶结合物的制备

B.1 材料

B.1.1 猪瘟病毒 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-氨嘌呤-胸苷培养基添加物(50×)(HYPOXANTHINE-THYMIDINE MEDIA SUPPLEMENT, HT)、次黄嘌呤-氨嘌呤-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:将猪瘟病毒 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。

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 ℃ 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。
