



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 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、邹兴启、朱元源、宁宜宝。

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,猪用疫苗生产中的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 $\geq 1:20\,480$ 。

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 $1\times$ 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≤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≥10%时,判为猪瘟抗体阳性;当血清样本的 IE 值≤8%时,判为猪瘟抗体阴性;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。

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'>ATAGGATCCACCATGGCATTCTCATCTGCTTGATAAAAGTATTAAG<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/min 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
(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 ℃ 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。