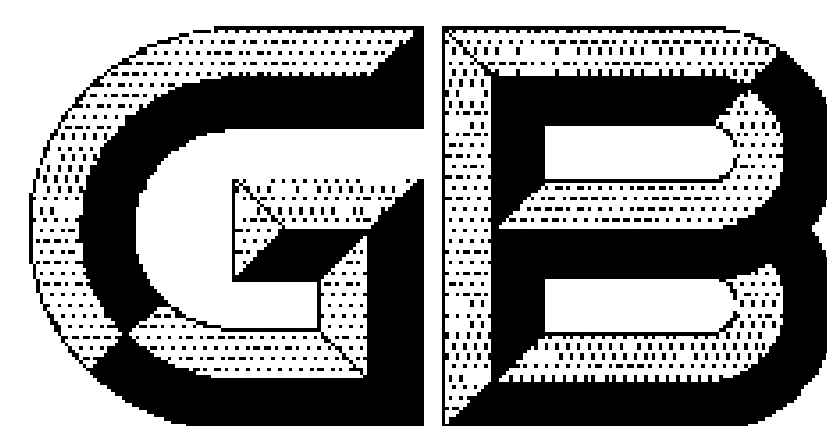




中华人民共和国国家标准

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 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:南京农业大学。
本标准起草人:姜平、王先炜、白娟、杨香林、刘捷。



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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $2.0\text{ }\mu\text{g/mL}$,加入 96 孔酶标反应板,每孔 $100\text{ }\mu\text{L}$,置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 h;
- b) 洗涤:倾去孔中液体,用 PBST 洗涤液(见 B.5)洗涤,每孔 $300\text{ }\mu\text{L}$,洗涤 3 次,每次 3 min,最后一次拍干;
- c) 封闭:每孔加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ 1%BSA(牛血清白蛋白)封闭液(见 B.2),置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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), $100\text{ }\mu\text{L/孔}$,置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下作用 1 h;
- e) 密封:置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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($\text{YP}_1\sim\text{YP}_n$)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 $50\text{ }\mu\text{L}$ 样品稀释液,再加 $50\text{ }\mu\text{L}$ 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；YP ₁ 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℃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℃孵育 30 min。该试剂使用前恢复到室温，使用后放回 2℃~8℃。

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℃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)：

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

阳性对照平均 OD 值(PC_x)见式(2)：

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

样品阻断率的计算见式(3)：

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

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 $OD_{600\text{ nm}}$ 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 $\times$ 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 $1.0\ \mu\text{g/mL}$ 稀释至 $0.2\ \mu\text{g/mL}$, 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 $0.25\ \mu\text{g/mL}$ 。

A.1.5 分装及保存

将检测合格的抗原分装到 $1.5\ \text{mL}$ 微量离心管中, 分装量为 $1\ \text{mL/管}$, 置 $-70\ ^\circ\text{C}$ 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 $2\ \text{mL/头}$, 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 $0.45\ \mu\text{m}$ 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 $-70\ ^\circ\text{C}$ 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 $0.45\ \mu\text{m}$ 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。

