

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

行业标准信息平台

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、乔薪瑗、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。

行业标准信息服务平台

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 μL ~200 μL 、100 μL ~1 000 μL 。

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 $3\text{ }\mu\text{g/mL}$,每孔 $100\text{ }\mu\text{L}$,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 $250\text{ }\mu\text{L}$ 洗涤液,振荡洗涤 3 次,每次 5 min 。

6.2 封闭

每孔加入封闭液 $250\text{ }\mu\text{L}$,置于 37°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 $250\text{ }\mu\text{L}$,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 $100\text{ }\mu\text{L}$,同时加入阴性对照和阳性对照血清各 2 孔, $100\text{ }\mu\text{L/孔}$ 。置于 37°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 $100\text{ }\mu\text{L}$,置于 37°C 培养箱中反应 1 h ,洗板同上。

6.5 显色

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

6.6 终止反应

每孔加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 终止液终止反应。

6.7 读数

在酶标仪上读取 450 nm 吸光值(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(OD_{450}),计算阳性对照平均 OD_{450} 和阴性对照平均 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 OD_{450} 和阴性对照孔平均 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 $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 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-β-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
FGLLGTTLLNIDANYVENARTTIEYFIDFIDNVCMDEMARESQRNGIAPQSEALRKLSGIKFKGIN
FDNSSDYIENWNLQNRQRRTGTFVHFKPNILPYSASFTLNRSQPAHDNLMGTMWINAGSEIQVAG
FDYSCAFNAPANIQQFEHVPLRRALTTATITLLPDAERFSFPRVINSADGATTWYFNPVIIRPSN
VEVEFLNGQIINTYQARFGTHARNFDTIRLSFQLVRPPNMTPAVANLFPQAPPFIFHATVGLTL
RIESAVCESVLADASETLLANVTAVRQEYAIPVGPVFPPGMNWTTELITNYSPSREDNLQRVFTVA
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 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养基中,37℃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-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)进行诱导,37℃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℃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 μL、2.5 μL 和 1 μL 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(Na_2CO_3 ,分析纯)	1.59 g
碳酸氢钠(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(KH_2PO_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(NaCl ,分析纯)	8.0 g
氯化钾(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

行业标准信息平台



行业标准信息

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

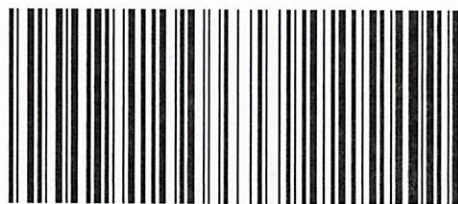
* * *

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