

团 体 标 准

T/CVMA X34—2019

口蹄疫病毒非结构蛋白 3ABC 抗体时间分辨荧光免疫分析检测方法

Time-resolved Fluoroimmunoassay Method for Detection of FMDV 3ABC
Virus Antibody

2019- XX-XX 发布

2019- XX-XX 实施

中 国 兽 医 协 会 发 布

前 言

本标准按 GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由中国兽医协会提出并归口。

本标准起草单位：中国动物疫病预防控制中心、洛阳现代生物技术研究有限公司、辽宁省动物疫病预防控制中心、甘肃省动物疫病预防控制中心、新疆维吾尔自治区动物疫病预防控制中心、山东省动物疫病预防控制中心、黑龙江省动物疫病预防控制中心、江西省动物疫病预防控制中心、重庆市动物疫病预防控制中心、云南省动物疫病预防控制中心、广西壮族自治区动物疫病预防控制中心。

本标准主要起草人：孙雨、王传彬、宋晓晖、李秀梅、王睿男、肖颖、赵晓春、王文、曹丽萍、央珍、蒋菲、杨林、肖开提、阿不都克里木、康文彪、魏润生、曾邦权、邹联斌、韦正吉、李硕、韩焘、赵柏林、田夫林、王贵升、原小燕、刘近、甘平、徐亚东、杨志、林汉亮、马晓艳、周智、任雪建、马英、吕园园、刘明瑞、亢文华、李晓霞、毕一鸣、康新华、王文莉、顾贵波、贾俊元、徐峥嵘、郑红飞、豆玲、张莉、毋艳萍、沙娜瓦尔·塔西、乌那尔汗·吉斯汗、马伟、杨天意、孙航、张月、蔺晓月、马慧玲、薛瑞雪、兰邹然、格桑央宗、德吉玉珍、边巴央拉、扎西卓玛。

口蹄疫病毒非结构蛋白 3ABC 抗体时间分辨荧光免疫分析检测方法

1 范围

本标准规定了口蹄疫病毒非结构蛋白 3ABC 抗体时间分辨荧光免疫分析检测方法。

本标准适用于时间分辨荧光法检测猪、牛、羊等动物血清中的口蹄疫病毒非结构蛋白 3ABC 抗体，可以用来鉴别诊断野毒感染和免疫动物。

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。

NY/T 541-2016 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范执行。

3 试剂与耗材

3.1 口蹄疫病毒非结构蛋白 3ABC 全长蛋白，见附录 A。

3.2 口蹄疫病毒非结构蛋白 3ABC 钬标记单克隆抗体，见附录 B。

3.3 包被缓冲液，见附录 C.1。

3.4 封闭液，见附录 C.2。

3.5 钬标记结合物稀释液，见附录 C.3。

3.6 样品稀释液，见附录 C.4。

3.7 10mM PBS 缓冲液，见附录 C.5

3.8 阳性对照，见附录 C.6。

3.9 阴性对照，见附录 C.7。

3.10 10 倍浓缩洗涤液，见附录 C.8。

3.11 增强液，见附录 C.9。

4 器材与设备

4.1 时间分辨荧光免疫分析仪。

4.2 分析天平。

4.3 洗板机。

4.4 振荡器。

4.5 2℃~8℃冰箱，-20℃冰箱。

4.6 单道微量移液器（0.5 μL~10 μL；10 μL~100 μL；20 μL~200 μL；100 μL~1 000 μL）。

4.7 多道移液器（300μL）。

4.8 NUNC 反应板。

4.9 血清稀释板：96孔一次性U型血凝板或96孔细胞培养板。

4.10 一次性注射器（5mL~10mL）。

5 技术原理

采用竞争反应原理，包被板上包被A型重组蛋白，待检样品中的特异性抗体和钕标记抗体竞争性结合重组蛋白，待检样品中抗体剂量值的高低与发光信号值成反比，通过校准曲线拟合计算，即可检测出待检样品中的抗体。

6 实验前准备工作

6.1 样本采集及处理

采集静脉血时，每头猪、牛或羊使用一个注射器。进行静脉无菌采血，不少于2mL。室温静置于斜面2h，待血液自然凝固后，置2℃~8℃冰箱中放置不少于2h，4000r/min离心10min。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，应置于-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

使用包被缓冲液将3ABC全长蛋白稀释至1/1000。每孔加100 μl。置于4℃包被16~24h。

7.2 洗板

弃去包被液，用25倍浓缩洗涤液稀释成1倍洗涤液，洗板2次。

7.3 封闭

每孔加入150 μl封闭液，置于4℃封闭16~24h。

7.4 洗板

弃去封闭液，在吸水纸上拍干。

7.5 干燥

置于37℃干燥3~5h。装入铝箔袋，加干燥剂，抽真空，置于2℃~8℃保存备用。

7.6 样品稀释

在血清稀释板中，用样品稀释液将待检样品按照1:5比例进行稀释。例如：20 μl样品加80 μl样品稀释液。

7.7 加样

取出包被板，加入100 μl没有稀释的阴性对照和阳性对照，每次检测各加两孔；在相应的孔中加入100 μl已稀释好的样品（用样稀5倍稀释样品）。

7.8 振荡孵育

置室温条件下振荡反应60分钟（±1分钟）。

7.9 洗板

将各孔的液体弃入废液筒，用280 μL（±20 μL）洗涤液洗涤板孔，共洗涤5次，每次洗涤后应弃去孔内的液体。最后一次洗涤液弃去后，将孔中残留的洗涤液在吸水纸上拍干。

7.10 加铋标记结合物

每孔加入100 μL铋标记结合物。

7.11 振荡孵育

置室温条件下振荡反应30分钟（±1分钟）。

7.12 洗板

将各孔的液体弃入废液筒，用300 μL洗涤液洗涤板孔，共洗涤5次。每次洗涤后应弃去孔内的液体。在最后一次洗涤液弃去后，将孔中残留的洗涤液在吸水纸上拍干。

7.13 加入增强液

每孔加入100 μL的时间分辨荧光增强液，振荡混匀。

7.14 振荡孵育

置室温条件下振荡反应5分钟（±1分钟）。

7.15 读取荧光值

在时间分辨荧光免疫分析仪读取荧光值，并根据荧光值计算抑制率(Inh%)。

$\%抑制率(Inh\%) = (\text{阴性对照孔荧光值} - \text{样品孔荧光值}) / \text{阴性对照孔荧光值} \times 100\%$ 。

8 实验成立条件与结果判定描述

8.1 实验成立条件

阴性对照荧光值 > 10倍阳性对照荧光值，且阳性对照抑制率 ≥ 55%

8.2 结果判定

阳性：猪血清样品抑制率（Inh%） $\geq 20\%$ ，牛羊血清样品的抑制率（Inh%） $\geq 25\%$ ，判定为检测阳性，表述为检出口蹄疫病毒非结构蛋白3ABC血清抗体。

阴性：猪血清样品抑制率（Inh%） $< 20\%$ ，牛羊血清样品的抑制率（Inh%） $< 25\%$ ，判定为检测阴性，表述为未检出口蹄疫病毒非结构蛋白3ABC血清抗体。

中国兽医协会
CVMA

附录 A

(规范性附录)

口蹄疫病毒非结构蛋白 3ABC 全长蛋白的制备

A. 1. 1 生产用菌液繁殖

将生产用细菌种子按 1:100 比例转接含卡纳霉素 (100 μ g/ml) LB 液体培养基中, 置 37 $^{\circ}$ C 培养至 OD_{600nm} 值约为 0.65, 收集菌液。

A. 1. 2 重组蛋白的诱导表达

将生产用菌液加入终浓度为 1mmol/L 的 IPTG, 继续诱导 6 小时, 收集诱导表达菌液。

A. 1. 3 重组蛋白提取和纯化

将诱导后的菌液, 在 2~8 $^{\circ}$ C 条件下、以 10000r/min 离心 3 分钟收集菌体, 菌体沉淀用适量的超声破菌缓冲液 (20mmol/L Tris-HCl pH 值 8.0、0.5mol/L 氯化钠、1mmol/L EDTA、1mg/ml 溶菌酶) 重悬, 超声破碎, 功率为 300W, 破碎 15 秒, 间隔 15 秒, 每个循环 30 秒, 总时间 20 分钟。破碎后的匀浆在 2~8 $^{\circ}$ C 条件下、以 12000r/min 离心 2 分钟, 取包涵体沉淀进行纯化, 纯化后的产物即为包被抗原。

附录 B

(规范性附录)

口蹄疫病毒非结构蛋白 3ABC 单克隆抗体的铕元素标记

B.1 杂交瘤细胞繁殖

将生产用细胞株 5E12D5, 用含有 15%胎牛血清的高糖型 DMEM 培养液 (pH 值 7.0) 制成细胞悬液, 置 37°C、含 5%CO₂ 培养箱中培养 48~72 小时, 细胞能够稳定分裂繁殖, 可长成单层。

B.2 小鼠腹水制备

选取 12~16 周龄健康雄性 Balb/c 小鼠, 按 0.5ml/只腹腔注射弗氏不完全佐剂, 7~10 日后每只小鼠腹腔接种 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个 5E12D5 株杂交瘤细胞, 经 7~10 日后可见小鼠腹部明显膨大, 无菌操作采集腹水。采集的腹水以 8000r/min 离心 10 分钟, 弃去上层脂肪层, 收集中层腹水, -20°C 冻存备用。

B.3 单克隆抗体的纯化

采用辛酸饱和硫酸铵沉淀法, 对制备的含有单克隆抗体的腹水进行纯化, 纯化后的单克隆抗体无菌定量分装, -20°C 以下保存备用。

B.4 单克隆抗体的铕元素标记

按照标记 1mg 抗体需要 0.2mg DTTA-EuNA 标记试剂, 按质量比为 5:1, 将待标记抗体和标记试剂充分混匀, 置于摇床上 25°C 孵育过夜。然后用 Sephadex™ G-50 柱凝胶层析柱纯化铕标记的单克隆抗体。

附录 C

(规范性附录)

相关试剂的配制

C.1 包被缓冲液

50mM 碳酸盐缓冲液 (15mM Na₂CO₃, 34.9mM NaHCO₃, PH 9.6), 放置 4℃ 备用, 保存期一周。

C.2 封闭缓冲液

10mM PBS 碳酸盐缓冲液, 137mM 十二水磷酸氢二钠, 2mM 磷酸二氢钾, 137mM 氯化钠, 2.7mM 氯化钾, 1.5% (m/v) casein, 5% (m/v) 海藻糖, 6% (m/v) 蔗糖。待以上试剂完全溶解之后, 加入 2% PC300, 置于 4℃ 保存。

C.3 铋标记结合物稀释液

Tris-base 30.3g, NaCl 45g, NaN₃ 5g, Tween-20 0.5 ml, 脱脂奶 25g, 酪蛋白 16g, PH=7.8, 充分混匀, 定容到 500mL, 0.22 μm 过滤。4℃ 保存。

C.4 样品稀释液

10mM PBS 缓冲液, 10mM 十二水磷酸氢二钠, 2mM 磷酸二氢钾, 137mM 氯化钠, 2.7mM 氯化钾, 1.5% (m/v) casein, 0.5% (m/v) BSA, 6.48mM 氨基比林, 0.91mM 硫酸庆大霉素, 0.15% (m/v) S9。待以上试剂完全溶解之后, 加入 0.2% PC300, 0.1% 的 MIT, 置于 4℃ 保存。成品试剂盒中需加入绿色色素 0.01%, 搅拌混匀。

C.5 10mM PBS 缓冲液

10mM 十二水磷酸氢二钠, 2mM 磷酸二氢钾, 137mM 氯化钠, 2.7mM 氯化钾, 1.5% (m/v) casein, 0.5% (m/v) BSA, 6.48mM 氨基比林, 0.91mM 硫酸庆大霉素, 0.15% (m/v) S9。待以上试剂完全溶解之后, 加入 0.2% PC300, 0.1% 的 MIT, 置于 4℃ 保存。成品试剂盒中需加入绿色色素 0.01%, 搅拌混匀。

C.6 阳性对照

50mM 三羟基氨基甲烷, 140mM 氯化钠, 1.5% (m/v) casein, 6.48mM 氨基比林。待以上试剂完全溶解之后, 加入 0.2% PC300, 0.1% 的 MIT, 置于 4℃ 保存。成品试剂盒中需加入红色色素 0.01%, 搅拌混匀。

C.7 阴性对照

50mM 三羟基氨基甲烷, 调 pH 至 8.0, 140.3mM 氯化钠, 6.48mM 氨基比林, 1.5% (v/v) BSA 15g/L,

待以上试剂完全溶解之后,加入 0.2%(v/v)PC300,置于 4℃保存。成品试剂盒中需加入红色色素 0.01%,搅拌混匀。

C.8 10 倍浓缩洗涤液的配制

Tris 6.05g, NaCl 90g, Tween-20 2ml, 加入万分之一的柳硫汞用纯化水溶解定容至 1000ml。

C.9 增强液的配制

6mL 冰醋酸用 0.1mol/L 的邻苯二甲酸氢钾调 pH 值至 3.2, 加入 15 μ mol β -NTA, 50 μ mol TOP0, 1ml Triton X-100, 加三蒸水定容至 1L, 搅拌至溶液混合均匀即可。

中国兽医协会
CVMA