

ICS 11.220

B 41

团 体 标 准

T/CVMA X5—2019

新城疫病毒 V 蛋白抗体的间接 ELISA 检测方法

Indirect ELISA Based on Newcastle Disease Virus V Protein for Differentiating Infected from Vaccinated Chicken

2019- XX-XX 发布

2019 - XX -XX 实施

中 国 兽 医 协 会 发 布

目 次

前 言.....	II
引 言.....	III
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 缩略语.....	1
4 原理.....	1
5 试剂.....	1
6 耗材.....	2
7 仪器.....	2
8 溶液配制.....	2
9 实验步骤.....	2
10 结果判定.....	3
附录 A（规范性附录）.....	4
附录 B（规范性附录）.....	5
附录 C（规范性附录）.....	6
附录 D（规范性附录）.....	7
附录 E（资料性附录）.....	8
参考文献.....	9

前 言

本标准按照 GB/T 1.1-2009 给出的标准起草。

本标准涉及专利“任涛.一种鉴别新城疫感染与免疫的间接 ELISA 方法:中国,201810022726.3[P].”。

本标准由中国兽医协会提出并归口。

本标准起草单位：华南农业大学兽医学院。

本标准主要起草人：任涛、徐成刚、廖明、于得水、梁健鹏、谢鹏、向斌、林秋燕。

中国兽医协会
CVMA

引 言

本标准的发布机构提请注意，声明符合本标准时，可能涉及到专利“任涛.一种鉴别新城疫感染与免疫的间接 ELISA 方法:中国,201810022726.3[P].”的使用。

本标准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标准的发布机构保证，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标准的发布机构备案。相关信息可以通过以下联系方式获得：

专利持有人姓名：任涛；

地址：华南农业大学兽医学院；

办公室电话：020-85284899；

请注意除上述专利外，本标准的某些内容仍可能涉及专利，本标准的发布机构不承担识别这些专利的责任。

中国兽医协会
CVMA

新城疫病毒 V 蛋白抗体的间接 ELISA 检测方法

1 范围

本标准规定了新城疫病毒（NDV）V 蛋白抗体检测方法——间接 ELISA 方法的检测试剂、仪器设备、实验操作步骤。

本标准用于鉴别新城疫疫苗（包括灭活疫苗和弱毒疫苗）免疫鸡群血清（ ≥ 30 份）中是否存在 NDV V 蛋白抗体。

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。

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

3.1 中国科学院 Chinese Academy of Sciences CAS

3.2 酶联免疫吸附试验 Enzyme linked immunosorbent assay ELISA

3.3 异丙基硫代半乳糖苷 Isopropyl β -D-Thiogalactoside IPTG

3.4 新城疫病毒 Newcastle disease virus NDV

3.5 磷酸化蛋白 Phosphate protein P

3.6 磷酸盐缓冲液 Phosphate buffer saline PBS

3.7 含 0.05% Tween-20 的磷酸盐缓冲液 Phosphate Buffered Saline Tween-20 PBST

3.8 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine TMB

4 原理

利用大肠杆菌原核表达系统表达纯化的 V 蛋白特异性羧基端结构域（Vc）的重组蛋白作为抗原，包被于酶标板中，对新城疫疫苗（包括灭活疫苗和弱毒疫苗）免疫鸡群血清样品进行检测。若待测血清中存在新城疫 V 蛋白抗体，则会与包被于酶标板中重组蛋白 Vc 特异性结合，在辣根过氧化物酶标记抗体的作用下，形成的酶标抗体抗原复合物与显色剂发生反应，用酶标仪测定吸光度，即可根据吸光度值判定检测样品中是否含有新城疫 V 蛋白抗体。

5 试剂

5.1 磷酸氢二钠，分析纯，Cas: 7558-79-4;

5.2 磷酸二氢钠，分析纯，Cas: 7558-80-7 ;

5.3 氯化钠，分析纯，Cas: 7647-14-5;

- 5.4 碳酸氢钠, 分析纯, Cas: 144-55-8;
- 5.5 碳酸钠, 分析纯, Cas: 497-19-8;
- 5.6 吐温-20 (Tween-20), 分析纯, Cas: 9005-64;
- 5.7 NDV Vc 标准抗原 (见附录 A, 本标准参考包被浓度为 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 参考稀释方法为 1:50 与抗原包被液混合稀释);
- 5.8 脱脂奶粉 (ELISA 实验封闭专用, 非食用奶粉);
- 5.9 阳性血清 (见附录 B 和附录 C) (本标准参考稀释方法为 1:50 与 PBS 混合稀释);
- 5.10 阴性血清 (见附录 B 和附录 C) (本标准参考稀释方法为 1:50 与 PBS 混合稀释);
- 5.11 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鸡 IgG (商品化, 本标准参考稀释方法为 1:8 000 与 PBS 混合稀释);
- 5.12 TMB 单组份显色液 (商品化);
- 5.13 终止液 (商品化, 1 mol/L H_2SO_4);
- 5.14 去离子水 (符合 GB/T 6682 二级水)。

6 耗材

- 6.1 中结合力微量反应板(适合作为分子量 >20 kD的大分子蛋白的固相载体, 蛋白结合能力为 200~300 ng IgG/cm²)。
- 6.2 封板膜。

7 仪器

- 7.1 酶标仪 (配备 450 nm 滤光片);
- 7.2 分析天平 (分度值 0.01 g);
- 7.3 湿盒;
- 7.4 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱;
- 7.5 pH 计;
- 7.6 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

8 溶液配制

8.1 PBS

分别称取 0.62 g 磷酸二氢钠、5.73 g 磷酸氢二钠和 9 g 氯化钠, 加入去离子水溶解定容至 1 000 mL, 在 pH 计上调节溶液 pH=7.4。

8.2 PBST

量取 PBS (见 7.1) 1 000 mL, 加入 0.5 mL 吐温-20, 混匀。

8.3 抗原包被液

碳酸盐缓冲液: 碳酸氢钠 2.93 g, 碳酸钠 1.59 g, 加入去离子水溶解定容至 1 000 mL, 在 pH 计上调节溶液 pH=9.6, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

8.4 封闭液

含 7.5%脱脂奶粉的 PBS: 称取 3.75 g 脱脂奶粉 (见 5.8), 加入 PBS (见 7.1) 溶解定容至 50 mL。

9 实验步骤

- 9.1 抗原稀释：使用抗原包被液（见 8.3）将 NDV Vc 标准抗原稀释至工作浓度 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ （抗原工作浓度筛选方法见附录 C）。
- 9.2 抗原包被：100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 稀释好的抗原加入微量反应板（见 6.1），4 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜（12~14 h），使用 PBST（见 8.2）100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，洗板 5 次后甩净，再在滤纸上拍打吸干。
- 9.3 封闭：加入 200 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 封闭液（见 8.4），封板膜封板，置于湿盒中，37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中静置 2 h 后，使用 PBST（见 8.2）洗板 5 次后甩净，再在滤纸上拍打吸干。
- 9.4 孵育一抗：待检血清、阳性血清和阴性血清均按 1:50 的比例与 PBS 混匀稀释（血清稀释比例筛选方法见附录 C），加入 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 稀释好的血清，阴、阳性血清样品各做至少 2 个重复，封板膜封板，置于湿盒中，37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中孵育 1 h 后，使用 PBST（见 8.2）洗板 5 次后甩净，再在滤纸上拍打吸干。
- 9.5 孵育酶标二抗：加入 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 稀释好的辣根过氧化物酶标记的羊抗鸡 IgG（见 5.11），封板膜封板，置于湿盒中，37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中孵育 1 h 后，使用 PBST（见 8.2）洗板 5 次后甩净，再在滤纸上拍打吸干。
- 9.6 显色（避光）：加入 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ TMB 单组份显色液（见 5.12），封板膜封板，置于湿盒中，室温 25 $^{\circ}\text{C}$ ，避光显色 10 min。
- 9.7 终止显色（避光）：加入 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 终止液（见 5.13）终止显色。
- 9.8 读数（避光）：将微量反应板置于酶标仪（见 7.1）中，以 450 nm 波长测定血清的吸光度。

10 结果判定

- 10.1 结果计算：为了降低环境因素和人为因素等差异对检测结果的影响，引入 S/P 值 = (待测样本 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 平均值 - 阴性对照 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 平均值) / (阳性对照 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 平均值 - 阴性对照 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 平均值) 对该 ELISA 方法的检测结果进行校正。即通过设定阴性对照血清和阳性对照血清的 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 平均值来计算 S/P 值，并以 S/P 值作为最终判定标准。
- 10.2 判定标准（检测鸡群血清 ≥ 30 份）
- 10.2.1 阳性结果：当检测样本的 S/P 值的平均值 ≥ 0.29 时判定为阳性，鸡群感染 NDV 强毒（见附录 D 和附录 E）。
- 10.2.2 阴性结果：当检测样本的 S/P 值的平均值 ≤ 0.25 时判定为阴性（见附录 D 和附录 E）。
- 10.2.3 可疑结果：当 $0.25 \leq$ 检测样本的 S/P 值的平均值 ($\text{OD}_{450\text{ nm}}$) ≤ 0.29 时为疑似感染 NDV 强毒，需要重新测定（见附录 D 和附录 E）。

附 录 A
(规范性附录)

新城疫病毒 (NDV) Vc 标准抗原的制备方法

Vc 蛋白核苷酸序列为 NDV V 基因与 P 基因羧基端不同区域的核苷酸序列。

在 1 mmol/L IPTG 诱导作用下,利用大肠杆菌 BL21 株将 N-端融合 His 标签的重组质粒 pET-32a-Vc 在 16℃诱导表达 8~16 h, 摇速 150~180 r/min; 使用 SDS-PAGE 和 Western Blot 方法对目的蛋白进行可溶性分析与鉴定; 然后再使用镍离子亲和层析法和蛋白胶切胶回收法对目的蛋白进行纯化。

中国兽医协会
CVMA

附录 B
(规范性附录)

新城疫病毒 (NDV) Vc 标准抗原阳性血清及阴性血清的制备方法

阳性血清的制备：将纯化后的 NDV Vc 标准抗原分别与商品化完全弗氏佐剂和商品化不完全弗氏佐剂以 1:1 体积比混合成油包水乳剂。第 1 次免疫用混合了完全弗氏佐剂的油包水乳剂，0.2 mL/只免疫 3 周龄 SPF 鸡；3 周后进行第 2 次免疫，第 2 次免疫时用混合了不完全弗氏佐剂的油包水乳剂，0.5 mL/只免疫 3 周龄 SPF 鸡。第 2 次免疫后 28 d 对免疫鸡群进行静脉采血，待血液 37℃ 凝固分层后收集上层血清。

阴性血清的制备：对 SPF 鸡进行静脉采血，血液 37℃ 静置 2 h，待其凝固分层后 3 000 rmp/min 离心 10 min，收集上层血清。

中国兽医协会
CVMA

附录 C
(规范性附录)

新城疫病毒 (NDV) Vc 标准抗原最佳抗原包被浓度和最佳血清稀释倍数的确定

通过 BCA 蛋白浓度检测试剂盒测定纯化后的 NDV Vc 标准抗原浓度, 进行方阵滴定试验, 具体操作为: 取 96 孔酶标板, 将 NDV Vc 标准抗原分别用抗原包被液 2 倍倍比稀释 5 次, 横排抗原包被浓度分别为 0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 和 6.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 μL /孔包被微量反应板, 封板膜封板, 置于湿盒中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜, 使用 PBST (见 8.2) 洗板 5 次后甩净, 再在滤纸上拍打吸干; 100 μL /孔加含 7.5% 脱脂奶粉的 PBS (见 8.1), 封板膜封板, 置于湿盒中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h, 使用 PBST (见 8.2) 洗板 5 次后甩净, 再在滤纸上拍打吸干; 竖排阴、阳性血清样品用 PBS (见 8.1) 按 1:25、1:50、1:100 和 1:200 稀释, 封板膜封板, 置于湿盒中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h, 使用 PBST (见 8.2) 洗板 5 次后甩净, 再在滤纸上拍打吸干; 加入 1:8 000 稀释的 HRP 标记的羊抗鸡 IgG, 封板膜封板, 置于湿盒中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h, 使用 PBST (见 8.2) 洗板 5 次后甩净, 再在滤纸上拍打吸干; 加入 TMB 单组份显色液, 封板膜封板, 置于湿盒中, 室温作用 10 min, 再加入 ELISA 终止液终止反应。

ELISA 反应后的阳性血清 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 平均值在 1.0 左右, 且 P/N 值 (阳性血清 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 平均值/阴性血清 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 平均值) 最大的孔所对应的抗原包被浓度和血清稀释度为最佳抗原包被浓度和最佳血清稀释倍数。NDV Vc 标准抗原包被浓度与待检血清、阳性血清和阴性血清均按最佳值抗原包被浓度和血清稀释倍数稀释。

附 录 D
(规范性附录)
阴、阳性临界值的确定

选择 60 份经血凝抑制 (HI) 试验确定为 NDV 阴性的 SPF 鸡血清, 用附录 C 选择的最优 ELISA 反应条件进行检测, 并计算这 60 份血清样品 $OD_{450\text{ nm}}$ 值的平均值 (\bar{X}) 和标准差 (S.D.)。然后利用统计学原理, 来确定判定血清样品为阴性或阳性的临界值。

经计算 60 份阴性血清 $OD_{450\text{ nm}}$ 值 (见附录 E) 的平均值 (\bar{X}) 为 0.164, 标准差 (S.D.) 为 0.043, 根据统计学原理计算 $\bar{X}+3S.D.=0.293$, $\bar{X}+2S.D.=0.250$ 。为了方便计算, 确定当样品 $OD_{450\text{ nm}}$ 值 ≥ 0.29 时判定为阳性, 当样品 $OD_{450\text{ nm}}$ 值 ≤ 0.25 时判定为阴性, 当 $0.25 \leq$ 检测样本的 S/P 值的平均值 ($OD_{450\text{ nm}}$) ≥ 0.29 时为可疑值, 需做进一步验证。

附 录 E
(资料性附录)
新城疫病毒阴性血清间接 ELISA 结果实例参照

60 份 NDV 阴性血清的间接 ELISA 结果

样本序号	OD _{450 nm} 值									
1~10	0.201	0.177	0.144	0.227	0.136	0.17	0.130	0.165	0.196	0.306
11~20	0.211	0.181	0.127	0.151	0.213	0.164	0.151	0.165	0.119	0.127
21~30	0.091	0.152	0.130	0.145	0.122	0.276	0.161	0.160	0.111	0.217
31~40	0.162	0.149	0.136	0.137	0.243	0.102	0.116	0.135	0.190	0.217
41~50	0.148	0.171	0.170	0.150	0.112	0.136	0.186	0.177	0.163	0.118
51~60	0.158	0.134	0.154	0.271	0.205	0.126	0.193	0.186	0.161	0.124

参 考 文 献

- [1] 于得水. 基于新城疫病毒 V 蛋白鉴别感染与免疫的间接 ELISA 方法的建立[D]. 华南农业大学,2018.
-

中国兽医协会
CVMA