

团 体 标 准

T/CVMA 15—2020

新型冠状病毒动物血清抗体双抗原夹心酶 联免疫吸附试验检测方法

Detection of antibodies against SARS-CoV-2 by double antigen sandwich
ELISA in animal sera

2020 - 5 - 20 发布

2020 - 5 - 20 实施

中 国 兽 医 协 会 发 布

前 言

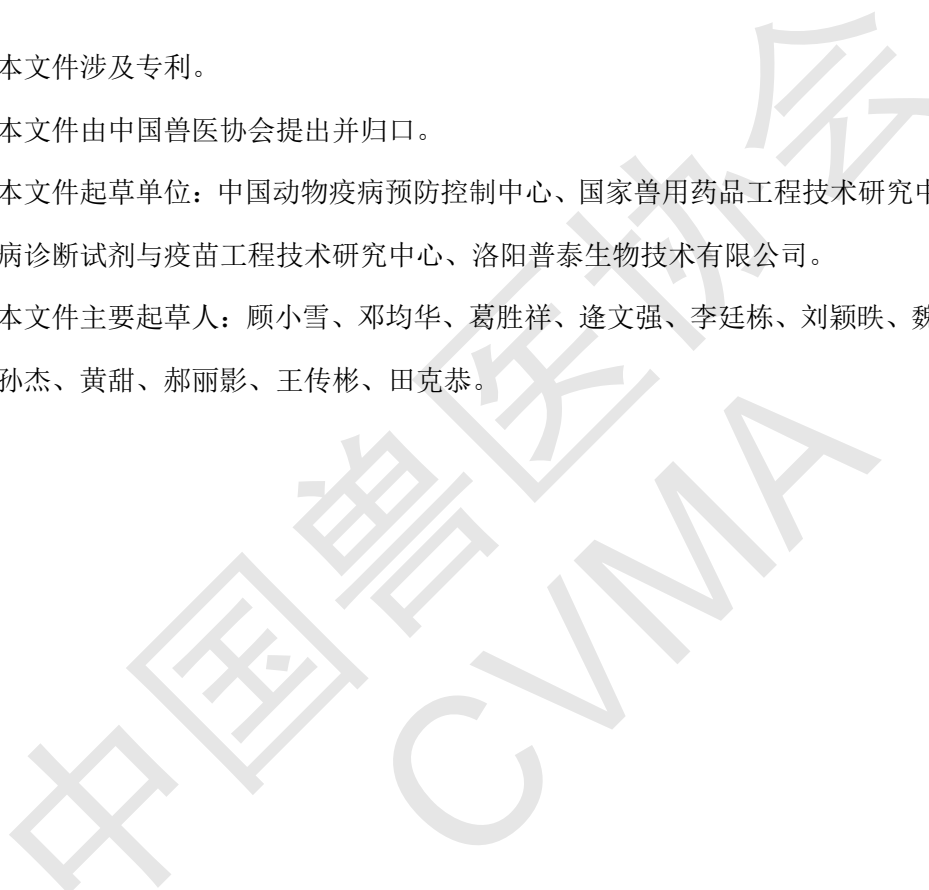
本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件涉及专利。

本文件由中国兽医协会提出并归口。

本文件起草单位：中国动物疫病预防控制中心、国家兽用药品工程技术研究中心、厦门大学、国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心、洛阳普泰生物技术有限公司。

本文件主要起草人：顾小雪、邓均华、葛胜祥、逢文强、李廷栋、刘颖昞、魏巍、张硕、徐琦、刘洋、孙杰、黄甜、郝丽影、王传彬、田克恭。



引 言

本文件的发布机构提请注意，声明符合本文件时，可能涉及到新型冠状病毒重组蛋白S1抗原及双抗原夹心ELISA抗体检测试剂盒相关专利的使用。

本文件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文件的发布机构保证，他愿意同任何申请人在合理且无歧视的条款和条件下，就专利授权许可直接免费使用。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案。相关信息可以通过以下联系方式获得：

专利持有人姓名：国家兽用药品工程技术研究中心、洛阳普泰生物技术有限公司

地址：中国（河南）自由贸易试验区洛阳片区高新区华夏路6号六号公社1010室

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

新型冠状病毒动物血清抗体双抗原夹心酶联免疫吸附试验检测方法

1 范围

本文件规定了新型冠状病毒（SARS-CoV-2）动物血清抗体双抗原夹心酶联免疫吸附试验检测方法，包括技术原理、试剂与材料、仪器与设备、样品的采集与运输、检测操作步骤、结果判定和生物安全要求等。

本文件适用于家畜、家禽、经济动物、野生动物、实验动物、宠物等动物血清中新型冠状病毒抗体的筛查检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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

NY/T 1948 兽医实验室生物安全要求通则

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 技术原理

采用双抗原夹心 ELISA 反应原理，酶标板上包被 SARS-CoV-2 重组蛋白 S1 抗原，待检样品中的 SARS-CoV-2 特异性抗体与包被的 SARS-CoV-2 重组蛋白 S1 抗原结合，加入含辣根过氧化物酶（HRP）标记 SARS-CoV-2 重组蛋白 S1 抗原的酶标试剂进行温育。当样品中存在 SARS-CoV-2 抗体时，形成“包被抗原-抗体-酶标抗原”复合物，复合物上连接的 HRP 催化显色剂反应，生成蓝色产物，终止反应后变为黄色。若样品中无 SARS-CoV-2 抗体，则不显色。

5 试剂与材料

5.1 SARS-CoV-2 重组蛋白 S1 抗原，按照附录 A 制备。

5.2 HRP 标记 SARS-CoV-2 重组蛋白 S1 抗原，按照附录 B 制备。

- 5.3 包被缓冲液，按照附录 C.1 制备。
- 5.4 磷酸盐缓冲液（PBS），按照附录 C.2 制备。
- 5.5 封闭液，按照附录 C.3 制备。
- 5.6 20 倍浓缩洗涤液，按照附录 C.4 制备。
- 5.7 酶标稀释液，按照附录 C.5 制备。
- 5.8 显色剂 A 液，按照附录 C.6 制备。
- 5.9 显色剂 B 液，按照附录 C.7 制备。
- 5.10 终止液，按照附录 C.8 制备。
- 5.11 阳性对照，按照附录 C.9 制备。
- 5.12 阴性对照，按照附录 C.10 制备。
- 5.13 酶标板。
- 5.14 封板膜。
- 5.15 吸水纸。
- 5.16 铝箔袋。
- 5.17 干燥剂。
- 5.18 采血器（2 mL、5 mL、10 mL）。

6 仪器与设备

- 6.1 离心机。
- 6.2 真空包装机。
- 6.3 酶标仪。
- 6.4 洗板机。
- 6.5 分析天平。
- 6.6 37℃恒温培养箱。
- 6.7 2℃~8℃冰箱。
- 6.8 -20℃冰箱。
- 6.9 水浴锅。

6.10 单道微量移液器（0.5 μL ~10 μL ；10 μL ~100 μL ；20 μL ~200 μL ；100 μL ~1000 μL ）。

6.11 多道微量移液器（10 μL ~100 μL ；30 μL ~300 μL ）。

7 样品的采集与运输

7.1 样品要求

检测样品为动物血清。动物血清应澄清、透明，无溶血、无污染。

7.2 样品采集

进行无菌采血。采血时，每只动物使用一个采血器，采血量不少于1 mL。将血样倾斜放置于室温中静置2 h~4 h，待血液自然析出血清，必要时可低速离心（1000 g离心10 min~15 min），分离血清，56 $^{\circ}\text{C}$ 30 min灭活后备用。

7.3 样品的运输与保存

按照NY/T 1948进行样品的包装和标识，按照NY/T 541进行样品的运输。血清样品若在一周内检测，可置2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。若超过一周检测，应置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 及以下冷冻保存。

8 检测操作步骤

8.1 配制洗涤液

将20倍浓缩洗涤液用蒸馏水或去离子水20倍稀释后备用。

8.2 包被

用包被缓冲液将SARS-CoV-2重组蛋白S1抗原稀释至500 $\mu\text{g/L}$ ，包被酶标板，100 μL /孔，于37 $^{\circ}\text{C}$ 包被2 h，再转移至2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 包被16 h~24 h。

8.3 包被后洗板

弃去包被液，加入洗涤液300 μL /孔，洗涤板孔，洗板1次。弃去洗涤液，在吸水纸上拍干。

8.4 封闭

每孔加入150 μL 封闭液，置于2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 封闭16 h~24 h。弃去封闭液，在吸水纸上拍干。

8.5 干燥

置18 $^{\circ}\text{C}$ ~26 $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度不高于30%的条件下干燥3 h~6 h。将抗原包被板装入铝箔袋中，同时放入干燥剂，用真空包装机抽真空密封，于2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

8.6 加样

分别在对应的检测孔中加入待测样品 100 μL 。每板设置阳性对照 2 孔，阴性对照 2 孔，分别在相应孔中加入 100 μL 阳性对照和阴性对照，同时设置空白对照 1 孔。

8.7 样品温育

用封板膜封板后，置 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min。

8.8 样品温育后洗板

取出抗原包被板，揭掉封板膜，弃去反应液。加入洗涤液 300 μL /孔，洗涤板孔，共洗涤 5 次。最后一次洗涤后，将抗原包被板在吸水纸上拍干。

8.9 加酶标试剂

用酶标稀释液将 HRP 标记 SARS-CoV-2 重组蛋白 S1 抗原稀释至工作浓度，每孔加入 100 μL ，空白对照孔除外。

8.10 酶标试剂温育

用封板膜封板后，置 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min。

8.11 酶标试剂温育后洗板

取出抗原包被板，揭掉封板膜，弃去反应液。加入洗涤液 300 μL /孔，洗涤板孔，共洗涤 5 次。最后一次洗涤后，将抗原包被板在吸水纸上拍干。

8.12 加显色液

每孔先加入显色剂 A 液 50 μL 、再加入显色剂 B 液 50 μL ，轻轻振荡混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色 15 min。

8.13 加终止液

每孔加终止液 50 μL ，轻轻振荡混匀，10 min 内测定结果。

8.14 测定

设定酶标仪波长于 450 nm 处检测各孔 OD 值。

9 结果判定

9.1 试验成立条件

阳性对照孔 OD 值均应 ≥ 0.40 ，且阴性对照孔 OD 值均应 < 0.10 ，否则试验无效。

9.2 结果计算方法

9.2.1 样品 OD 值按照公式 (1) 计算:

$$\text{样品 OD 值} = \text{样品孔 OD 值} - \text{空白对照孔 OD 值} \cdots \cdots (1)$$

9.2.2 临界值 (CUT OFF) 按照公式 (2) 计算:

$$\text{临界值} = 0.26 + \text{阴性对照孔 OD 值均值 (阴性对照孔 OD 值均值低于 0.03 者以 0.03 计算)} \cdots \cdots (2)$$

9.3 结果判定标准

9.3.1 样品 OD 值 \geq 临界值 (CUT OFF) 者为 SARS-CoV-2 抗体筛查阳性。

9.3.2 样品 OD 值 $<$ 临界值 (CUT OFF) 者为 SARS-CoV-2 抗体筛查阴性。

9.3.3 结果判定为抗体筛查阳性的, 需现场调查、采样进行病原学验证。

10 生物安全要求

10.1 未经可靠方法灭活血清的检测以及临床血清样品的灭活等操作, 应按照 GB 19489 在生物安全柜或生物安全二级实验室内相对独立的实验区域进行, 同时采用生物安全三级实验室的个人防护。

10.2 使用过的一次性实验耗材、样品包装物等固体废弃物应密封包装并进行表面消毒, 再经高温高压处理后废弃; 实验过程中产生的液体废弃物应先置于消毒液中消毒, 再经高温高压处理后废弃。

附录 A

(规范性)

SARS-CoV-2 重组蛋白 S1 抗原的制备

A.1 生产用毒种的繁殖

取重组新型冠状病毒 S1 蛋白毒种 (mCoV-S1 株) 按 1:100 的比例接种生长状态良好的 Sf9 细胞 (细胞密度为 $2.0 \times 10^6 \sim 2.5 \times 10^6$ 个/mL), 27°C 、120 r/min 培养 72 h。

A.2 重组蛋白的表达与纯化

将生产用毒种按 1:100 的比例接种生长状态良好的 Sf9 细胞 (细胞密度为 $2.0 \times 10^6 \sim 2.5 \times 10^6$ 个/mL), 27°C 、120 r/min 培养 72 h 后收获细胞培养物。8000 r/min 离心 20 min, 取上清, 经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 获得滤液。

使用亲和层析柱 (Ni HisTrap HP) 对滤液进行蛋白纯化, 分别用去离子水和 A 液 (20 mmol/L Tris-NaCl, 150 mmol/L NaCl, pH 8.0) 平衡镍柱, 以 1 mL/min~2 mL/min 的流速将滤液上样至镍柱; 上样结束后加入含 30 mmol/L 咪唑的 A 液洗脱杂蛋白, 再加入含 300 mmol/L 咪唑的 A 液洗脱目的蛋白并收集, 将收集液在 B 液 (20 mmol/L NaH_2PO_4 , 50 mmol/L NaCl, pH 6.5) 中于 $2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$ 透析过夜。

将透析后的蛋白用阳离子交换柱 (SP Sepharose HP) 层析进行进一步纯化, 分别用去离子水和 B 液平衡 SP 柱, 以 1 mL/min~2 mL/min 的流速将透析后蛋白上样; 上样结束后用含 200 mmol/L NaCl 的 B 液洗脱杂蛋白, 再用含 500 mmol/L NaCl 的 B 液洗脱目的蛋白。

将 SP 柱纯化后的蛋白通过分子筛 (Hiload 16/600, Superdex 200 pg) 进行层析纯化。分别用去离子水和 C 液 (20 mmol/L NaH_2PO_4 , 150 mmol/L NaCl, pH 7.4) 平衡层析柱后, 以 1 mL/min 流速上样, 上样结束后继续用 C 液分离目的蛋白, 在出峰体积 75.5 mL~78 mL 时收集蛋白, -70°C 以下保存。

附录 B

(规范性)

HRP 标记 SARS-CoV-2 重组蛋白 S1 抗原的制备

B.1 SARS-CoV-2 重组蛋白 S1 抗原的 HRP 标记

称取 20 mg 辣根过氧化物酶(HRP)溶于 1 mL 超纯水中,加入 1 mL 现配的 NaIO_4 溶液(20 mg NaIO_4 溶于 1 mL 超纯水),混匀, $2^\circ\text{C}\sim 8^\circ\text{C}$ 避光作用 30 min; 在上述溶液中加入 20 μL 乙二醇, $2^\circ\text{C}\sim 8^\circ\text{C}$ 避光作用 30 min; 按照 1 mg 纯化的 SARS-CoV-2 重组蛋白 S1 加 100 μL 上述混合液的比例,将两者混匀后,加入到透析袋中,用碳酸盐缓冲液(0.05 mol/L, pH 9.6)于 $2^\circ\text{C}\sim 8^\circ\text{C}$ 透析 6 h。将透析后的混合液转移至 1.5 mL 离心管中,加入 10 μL 现配的 NaBH_4 溶液(10 mg NaBH_4 溶于 1 mL 超纯水),室温作用 2 h,每隔 30 min 混匀一次。

B.2 HRP 标记 SARS-CoV-2 重组蛋白 S1 抗原的纯化

将得到的产物用分子筛(Hiload 16/600, Superdex 200 pg)层析去除游离的辣根过氧化物酶。分别用去离子水和 C 液(20 mmol/L NaH_2PO_4 , 150 mmol/L NaCl , pH 7.4)平衡层析柱后,以 1 mL/min 流速上样,上样结束后继续用 C 液分离目的蛋白,在出峰体积 70.5 mL~73 mL 时收集蛋白, -70°C 以下保存。

B.3 HRP 标记 SARS-CoV-2 重组蛋白 S1 抗原工作浓度的测定

取 HRP 标记 SARS-CoV-2 重组蛋白 S1 抗原,用酶标稀释液分别进行 1:6000、1:8000 和 1:10000 稀释,按“8 检测操作步骤”分别检测阳性对照和阴性对照,取 P/N 值(阳性对照孔 OD 值/阴性对照孔 OD 值)最大的稀释度为 HRP 标记 SARS-CoV-2 重组蛋白 S1 抗原的工作浓度。

附录 C

(规范性)

相关试剂的配制

C.1 包被缓冲液

称取 1.59 g 碳酸钠 (Na_2CO_3)、2.93 g 碳酸氢钠 (NaHCO_3)，用超纯水溶解定容至 1000 mL，搅拌均匀，置 $2^\circ\text{C}\sim 8^\circ\text{C}$ 条件下保存。

C.2 磷酸盐缓冲液 (PBS)

称取 2.9 g 磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4)、0.2 g 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)、8 g 氯化钠 (NaCl)、0.2 g 氯化钾 (KCl)，用超纯水溶解后定容至 1000 mL，搅拌均匀。

C.3 封闭液

称取蔗糖 50 g，加入 200 mL 新生牛血清、0.5 mL ProClin-300，补加 PBS 定容至 1000 mL，搅拌均匀，置 $2^\circ\text{C}\sim 8^\circ\text{C}$ 条件下保存。

C.4 20倍浓缩洗涤液

称取氯化钠 (NaCl) 160 g、磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4) 58 g、磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) 4.8 g、氯化钾 (KCl) 4 g、超纯水 800 mL、吐温 20 10 mL，完全溶解后用超纯水定容至 1000 mL，搅拌均匀。使用前将 20 倍浓缩洗涤液用蒸馏水或去离子水 20 倍稀释，即 1 份 20 倍浓缩洗涤液加 19 份蒸馏水。

示例：20 mL 20 倍浓缩洗涤液加入 380 mL 蒸馏水。

C.5 酶标稀释液

量取 200 mL 新生牛血清、0.5 mL ProClin-300、0.5 mL 吐温 20，补加 PBS 定容至 1000 mL，搅拌均匀，置 $2^\circ\text{C}\sim 8^\circ\text{C}$ 条件下保存。

C.6 显色剂A液

称取磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4) 14.7 g、柠檬酸 ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) 9.3 g、过氧化脲 ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}_3$) 0.3 g、超纯水 800 mL，完全溶解后补加超纯水定容至 1000 mL，搅拌均匀，置 $2^\circ\text{C}\sim 8^\circ\text{C}$ 条件下保存。

C.7 显色剂B液

称取四甲基联苯二胺 (TMB) 0.2 g、无水乙醇 10 mL、超纯水 800 mL，完全溶解后补加超纯水定容至 1000 mL，搅拌均匀，置 $2^\circ\text{C}\sim 8^\circ\text{C}$ 条件下保存。

C.8 终止液

量取 111.7 mL 浓硫酸缓慢溶于超纯水，补加超纯水定容至 1000 mL，搅拌混匀，置 2℃~8℃条件下保存。

C.9 阳性对照

量取 10 mL SARS-CoV-2 重组蛋白 S1 抗原免疫兔血清（皮下注射 SARS-CoV-2 重组蛋白 S1 抗原 500 μg/只、间隔 14 日后再次免疫 1 次，14 日后采血分离血清）、200 mL 新生牛血清、0.5 mL ProClin-300，补加 PBS 定容至 1000 mL，搅拌混匀，置 2℃~8℃条件下保存。

C.10 阴性对照

量取 200 mL 新生牛血清、0.5 mL ProClin-300，补加 PBS 定容至 1000 mL，搅拌混匀，置 2℃~8℃条件下保存。