ICS 11.220
CCS B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA 86—2021

猪塞内卡病毒竞争 ELISA 抗体检测方法

Competitive ELISA detection method of antibodies against pocine Seneca virus A infection

中国兽医协会 CVMA

2021-12-23 发布　　2021-12-23 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 第一部分：标准化文件的的结构和起草规则》的规定起草。

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。

本文件由中国兽医协会提出并归口。

本文件起草单位：禾旭（郑州）生物技术有限公司、河南省动物疫病预防控制中心、郑州中道生物技术有限公司、郑州市动物疫病预防控制中心、三门峡市动物疫病预防控制中心、漯河市动物疫病预防控制中心、平顶山市动物疫病预防控制中心、许昌市动物疫病预防控制中心。

本文件主要起草人：李秀梅、闫若潜、谢彩华、刘近、邵光喜、杨转、任雪建、杨晓帆、姬杰菲、王建科、吕园园、石书霞、殷笑丹、刘明瑞、沈晓武、江涛、刘炜、吴磊、安利民、张和平、王大民。

中国兽医协会 CVMA

猪塞内卡病毒竞争 ELISA 抗体检测方法

1 范围

本文件规定了猪塞内卡病毒竞争ELISA抗体检测方法的试剂与耗材、器材与设备、实验原理、样品采集及处理、操作步骤、试验成立条件和结果判定标准等内容。

本文件适用于检测猪血清中A型塞内卡病毒感染抗体。

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文件的必不可少的条款。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。

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

ELISA:酶联免疫吸附试验（Enzyme Llinked Immunosorbent Assay）

BSA:牛血清白蛋白（Bovine Serum Albumin ）

PBS:磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffer Saline)

TMB:3,3',5,5'-四甲基联苯胺（3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine）

4 试剂与耗材

4.1 塞内卡病毒 VP1 重组蛋白，制备方法见附录 A。

4.2 阴性对照和阳性对照，制备方法见附录 B。

4.3 酶标结合物，制备方法见附录 C。

4.4 包被缓冲液，制备方法见附录 D.1。

4.5 封闭缓冲液，制备方法见附录 D.2。

4.6 样品稀释液，制备方法见附录 D.3。

4.7 25 倍浓缩洗涤液，制备方法见附录 D.4。

4.8 显色液 A，制备方法见附录 D.5。

4.9 显色液 B，制备方法见附录 D.6。

4.10 终止液，制备方法见附录 D.7。

5 器材与设备

5.1 分析天平(精确度:0.0001 g)。

5.2 37 ℃温箱。
5.3 2 ℃～8 ℃冰箱，-20 ℃冰箱。
5.4 高速冷冻离心机（最大转速 15000 r/min）。
5.5 酶标测定仪。
5.6 聚苯乙烯酶标板。
5.7 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）。
5.8 多道移液器（300 μL）。
5.9 血清稀释板：96 孔细胞培养板。
5.10 一次性采血管（5 mL、10 mL）。

6 实验原理

本文件采取酶联免疫竞争法，包被板上包被塞内卡病毒重组蛋白，加入待测样品和一定量的酶标抗体，两者竞争结合包被抗原，再加入显色底物显色后测定 OD_{450nm} 值。若待检样品中含有塞内卡病毒抗体越多，结合在包被抗原上的酶标抗体就越少，显色越浅，OD_{450nm} 值越低，待检样品中塞内卡病毒抗体的浓度与 OD_{450nm} 值成反比。

7 样品采集及处理

按照NY/T 541进行样品的采集、保存和运输。

建议进行静脉无菌采血，不少于2 mL。采集静脉血时，每只猪单独使用一个采血管。室温静置于斜面2 h，待血液自然凝固后，置2 ℃～8 ℃冰箱中放置不少于2 h，置高速冷冻离心机4000 r/min离心10 min，用移液器小心吸出上层血清。

血清样品若在一周内检测，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。采集的血清样品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。

8 操作步骤

8.1 抗原包被

8.1.1 包被

使用包被缓冲液将塞内卡病毒重组蛋白稀释，每孔加100μL（10μg/mL），置于4 ℃包被16 h～24 h。

8.1.2 洗板

弃去包被液，使用300μL的洗涤液洗板2次。也可使用全自动洗板机洗涤，将聚苯乙烯酶标板放入托盘中，打开开关；设置“冲洗”程序和洗涤参数，校正洗头位置，按下清洗键进行清洗；洗板完成后，蒸馏水冲洗管路，关闭开关，排空废液。

8.1.3 封闭

每孔加入150μL封闭液，置于4 ℃封闭16 h～24 h。

8.1.4 洗涤

弃去封闭液，用300μL多道移液器洗涤板孔，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。全自动洗板机操作步骤上同8.1.2。

8.1.5 干燥

置于37 ℃干燥3 h～5 h，置于2 ℃～8 ℃保存备用。

8.2 样品检测

取出抗原包被板，每块板可检测样品92份，设阳性对照2孔、阴性对照2孔；样品孔每孔加入25μL样品，阴、阳对照孔每孔加入25μL阴、阳对照，再向以上各孔中加入50μL酶标结合物，震荡混匀。

8.3 温育

在37 ℃条件下温育30 min（±1 min）。

8.4 洗涤

将各孔的液体弃入废液桶，用300μL多道移液器洗涤板孔，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。全自动洗板机操作步骤上同8.1.2。

8.5 显色

每孔加入50μL显色液A和50μL显色液B，振荡混匀（也可显色液A、B等比例混匀后加每孔加入100μL），应现配现用。

8.6 终止反应

在37 ℃条件下温育15 min（±1 min），每孔加入50μL终止液，终止反应。

8.7 读值

酶标测定仪测量并且记录阴性对照品、阳性对照品和样品的OD值(450 nm)，15 min内读值有效。

9 结果判定

9.1 试验成立条件

$$NC\overline{X}=(NC1+NC2)/2 \quad \cdots\cdots（1）$$

$$PC\overline{X}=(PC1+PC2)/2 \quad \cdots\cdots（2）$$

式中：

$NC\overline{X}$ ——阴性对照OD值平均值；

$PC\overline{X}$ ——阳性对照OD值平均值；

NC1、NC2——阴性对照OD值；

PC1、PC2 ——阳性对照OD值。

试验成立判断标准：NC $\overline{X}$ ＞0.6，PC $\overline{X}$ ＜0.2。

9.2 结果判定

样品的计算方法

S/N=（S/NC $\overline{X}$ ） ……（3）

式中：

S ——样品OD值；

NC $\overline{X}$ ——阴性对照OD值平均值。

若S/N≥0.6，样品判为抗体阴性；

若S/N＜0.6，样品判为抗体阳性；

中国兽医协会 CVMA

附录 A
（规范性）
塞内卡病毒 VP1 重组蛋白

A.1 生产用菌种构建

从 NCBI 上获得 Seneca virus A 病毒 VP1 蛋白的核酸序列，选择合适的酶切位点，克隆至 pET28a 载体之上。之后转化大肠杆菌表达感受态之中，经 PCR 鉴定无误之后加甘油保存菌种。菌液扩大培养，进行诱导表达，获得的重组蛋白进行 PAGE 和 WB 验证，确认无误之后将此作为种子置于-80℃长期保存。

A.2 生产用菌液繁殖

将生产用菌种种子按 1:100 比例转接含卡那霉素(100 μg/mL)的 LB 液体培养基中，置 37℃培养至 OD_{600nm} 值为 0.6，收集菌液。

A.3 重组蛋白的诱导表达

将生产用菌液加入 IPTG 至终浓度为 0.75 mmoL/L，16℃下继续诱导 12 h，收集诱导表达菌液。

A.4 重组蛋白提取和纯化

将诱导后的菌液，在 2 ℃～8 ℃条件下、以 8000 r/min 离心 10 min，弃上清，收集菌体沉淀，用 PBS（0.01 moL/L，pH 值 7.4）洗菌体沉淀三次，以 8000 r/min 离心 10 min，用 6 mL PBS（0.01 moL/L，pH 值 7.4）重悬菌体沉淀，在 150 W 功率的超声波的作用下冰浴裂解，有效时间为 10 min，工作时间为 5 s，间隔 5 s。将超声裂解物在 2 ℃～8 ℃、以 12000 r/min 离心 15 min，保留上清。将制备的上清穿过预处理过的树脂柱，重复 5～7 次，依次用 10 mmoL/L 咪唑缓冲液、20 mmoL/L 咪唑缓冲液、40 mmoL/L 咪唑缓冲液、60 mmoL/L 咪唑缓冲液、80 mmoL/L 咪唑缓冲液、100 mmoL/L 咪唑缓冲液、200 mmoL/L 咪唑缓冲液及 500 mmoL/L 咪唑缓冲液对重组蛋白进行洗杂和洗脱，收集洗脱液，并洗脱产生的滤液通过 Superdex200 凝胶柱分子筛进行进一步精细纯化，最后将纯化后的蛋白吸出加到透析袋中（8 kDa）浸泡在 2.0 L 的透析液中，透析过夜，-70 ℃保存。

中国兽医协会 CVMA

附录 B
（规范性）
阴性对照和阳性对照

B.1 阴性对照的制备

B.1.1 采血

对 1 头没有感染塞内卡病毒的健康猪进行静脉采血，经间接 ELISA 检测方法检测为塞内卡病毒抗体阴性。

B.1.2 制备血清

室温（15 ℃～25 ℃）待血液凝固后，37 ℃静置 2 h 后，然后 2 ℃～8 ℃静置 1 h，将析出的血清转移到离心瓶中，以 2000 r/min 离心 5 min，收集上清。

B.1.3 血清的分装及保存

将制备的血清混合均匀后，0.22 μm 滤膜过滤除菌，将血清与冻干保护剂按 8.5:1 比例混匀，无菌定量分装，1 mL/瓶，冷冻真空干燥，置-70 ℃以下保存，标记为“塞内卡病毒抗体阴性血清”，同时注明制备日期等信息。

B.2 阳性对照的制备

B.2.1 免疫与采血

用塞内卡病毒重组蛋白于每只塞内卡病毒抗体阴性猪耳背后肌肉注射，2 mL/头份。免疫后 1 周，每周无菌采血检测，用病毒中和试验检测检测塞内卡病毒抗体阳性，当抗体效价不低于 1:512 时，无菌采集免疫猪血液。

B.2.2 分装、冻干及保存

将制备的血清混匀后，经 0.22 μm 滤膜过滤除菌，将血清与冻干保护剂按 8.5:1 比例混匀，无菌定量分装，1 mL/瓶，冷冻真空干燥，置-70 ℃下保存，标记为“塞内卡病毒抗体阳性血清”，同时注明制备日期等信息。

附录 C
（规范性）
酶标结合物

C.1 塞内卡病毒单克隆抗体的制备

C.1.1 杂交瘤细胞繁殖

将生产用塞内卡病毒单抗细胞株用含有 15%胎牛血清的高糖型 DMEM 培养液（pH 值 7.0）制成细胞悬液，置 5% CO_2培养箱中培养 48 h～72 h，细胞能稳定分裂繁殖，长成单层。

C.1.2 小鼠腹水制备

采用体内诱生法制备单克隆抗体，选取 12～16 周龄健康雄性 BaLb/c 小鼠，按 0.5 mL/只腹腔注射弗氏不完全佐剂，7～10 日后每只小鼠腹腔接种 1×10^6～5×10^6个杂交瘤细胞，经 7～10 日后可见小鼠腹腔明显膨大，无菌操作采集腹水。采集的腹水以 8000 r/min 离心 10 min，弃去上层脂肪层，收集中层腹水，-70 ℃以下冻存备用。

C.1.3 单克隆抗体的纯化

采用辛酸-饱和硫酸铵沉淀方法，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，-70 ℃以下冻存备用。

C.2 酶标结合物的制备

称取 2 mg HRP 溶解于 0.5 mL 蒸馏水中，加入 0.5 mL 新配的 0.06 moL/L $NaIO_4$溶液，4 ℃避光 30 min。加入 160 mmoL/L 的乙二醇 0.5 mL，室温 30 min。加入纯化的单抗 2mg，混匀。将上述溶液装入透析袋中，置 2000 mL 的 0.05 mmoL/L CB 中透析，4 ℃搅拌过夜。透析液吸至 15 mL 的离心管中，加 0.2 mL 新配的 5 mg/mL $NaBH_4$液，混匀，4 ℃放置 12 h。将得到的产物用分子筛进行层析，把未和单抗结合的辣根过氧化物酶去除。将 HRP 标记好的单克隆抗体进行无菌定量分装，-70 ℃以下保存。

附录 D
（规范性）
相关试剂

D.1 包被缓冲液

准确称取 1.59 g 碳酸钠、2.93 g 碳酸氢钠，量取 1000 mL 纯化水，使用搅拌器搅拌使其完全溶解，使用酸度计测定 pH 值（要求 pH 9.6～9.8）。

D.2 封闭缓冲液

称取 2.9 g 磷酸氢二钠、0.2 g 磷酸二氢钾、8.0 g 氯化钠、0.2 g 氯化钾，量取 1000 mL 纯化水，搅拌溶解，使用酸度计测定 pH 值（要求 pH 值 7.2～7.4），再称取 BSA 20 g，蔗糖 50 g，加入其中，搅拌溶解后，再加入 0.5 mL ProcLin-300，0.5 mL 吐温-20，搅拌混匀。

D.3 样品稀释液

称取十二水合磷酸氢二钠 2.9 g、磷酸二氢钾 0.2 g、氯化钠 8.0 g、氯化钾 0.2 g，加入 800 mL 双蒸水搅拌溶解，加入 BSA 10 g、Proclin-300 1 mL、吐温 1 mL，用双蒸水定容至 1000 mL，过滤除菌。

D.4 25 倍浓缩洗涤液

称取十二水合磷酸氢二钠 72.5 g、磷酸二氢钾 5 g、氯化钠 200 g、氯化钾 5 g，加入 700 mL 双蒸水加热搅拌溶解，再加入 12.5 mL 的吐温-20，而后加双蒸水定容至 1000 mL。使用前将 25 倍浓缩洗涤液用蒸馏水或去离子水 25 倍稀释。1 份 25 倍浓缩洗涤液加 24 份蒸馏水。例如：40 mL 25 倍浓缩洗涤液加入 960 mL 蒸馏水。

D.5 显色液 A

称取柠檬酸 5.76 g、过氧化脲 0.5 g、乙酸钠 6.21 g，加入 800 mL 纯化水搅拌溶解，再加入 ProcLin-300 1 mL，而后加纯化水定容至 1000 mL，定量分装，2 ℃～8 ℃保存。

D.6 显色液 B

称取柠檬酸 5.76 g、底物显色液 TMB 0.2 g，加入甲醇 100 mL 溶解，再加入 ProcLin-300 1 mL，最后加纯化水水定容至 1000 mL，定量分装，2 ℃～8 ℃保存。

D.7 终止液

量取纯化水 876 mL，缓慢加入硫酸（2 moL/L）124 mL，搅拌均匀，而后加纯化水定容至 1000 mL，定量分装，2 ℃～8 ℃保存。