

团 体 标 准

T/BVMA 1—xxxx

塞内卡病毒抗体竞争 ELISA 检测方法

Competition ELISA Detection of Antibody of Senica Valley Virus

(征求意见稿)

xxx-xx-xx 发布

xxx- xx-xx 实施

中 国 兽 医 协 会 发 布

前 言

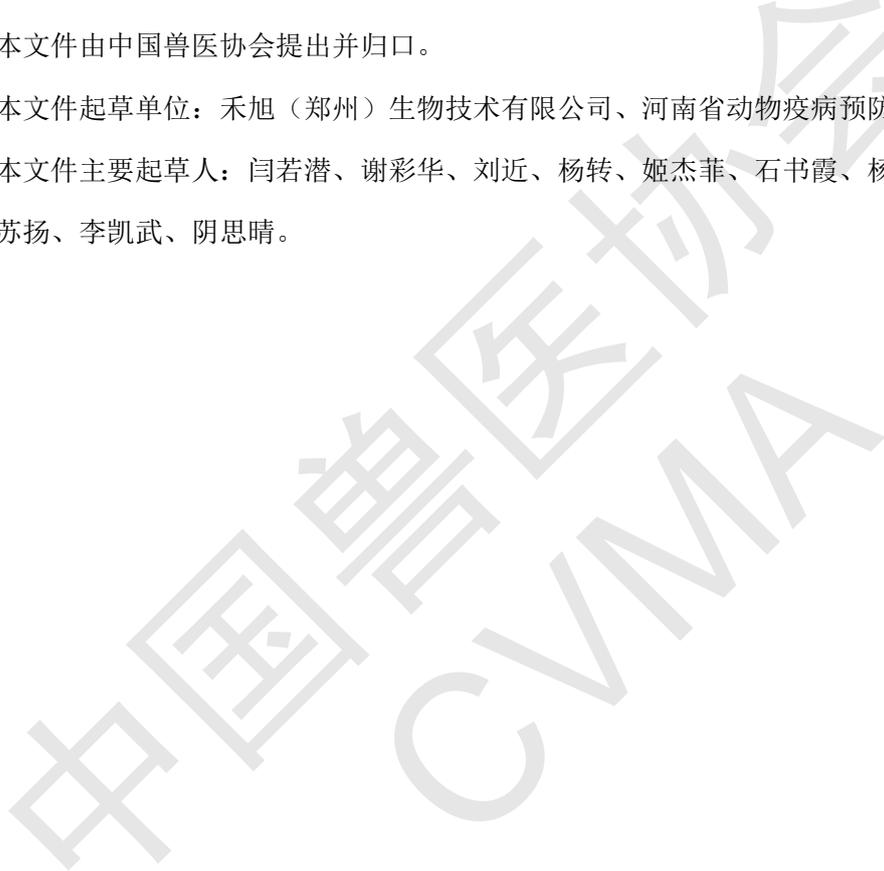
本文件按GB/T 1.1-2020给出的规则起草。

请文件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

本文件主要起草人：闫若潜、谢彩华、刘近、杨转、姬杰菲、石书霞、杨晓帆、殷笑丹、徐秀杰、苏扬、李凯武、阴思晴。



塞内卡病毒抗体竞争 ELISA 检测方法

1 范围

本文件规定了塞内卡病毒抗体竞争ELISA检测方法的试剂与耗材、器材与设备、技术原理、操作步骤、试验成立条件等内容。

本文件适用于竞争ELISA检测方法检测塞内卡病毒抗体，适用于养殖场塞内卡病毒感染的检测和免疫情况的监测，可用于动物疫病的调查。

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，仅注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 541-2016 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 塞内卡病毒重组蛋白，见附录 A。

3.2 酶结合物，见附录 B.1。

3.2 阴性对照，见附录 B.1。

3.3 阳性对照，见附录 B.2。

3.4 包被缓冲液，见附录 C.1。

3.5 封闭缓冲液，见附录 C.2。

3.6 样品稀释液，见附录 C.3。

3.7 浓缩洗涤液(25×)，见附录 C.4。

3.8 显色液 A，见附录 C.5。

3.9 显色液 B，见附录 C.6。

3.10 终止液，见附录 C.7。

4 器材与设备

4.1 酶标仪。

4.2 分析天平。

4.3 洗板机。

4.4 37℃温箱。

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（300 μL）。

4.8 酶联反应板。

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（5 mL~10 mL）。

5 实验原理

本标准采取酶联免疫竞争法，包被板上包被寨卡重组蛋白，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。若待检样品中含有寨卡病毒抗体越多，结合在包被抗原上的酶标抗体就越少，显色越浅，反之显色越深。

6 实验前准备工作

6.1 样本采集及处理

采集静脉血时，每只猪使用一个注射器。建议进行静脉无菌采血，不少于2 mL。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，4000 r/min离心10 min。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

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

7.2 洗板

弃去包被液，使用280 μL~300 μL的洗涤液洗板2次。

7.3 封闭

每孔加入150 μL封闭液，置于4℃封闭16 h~24 h。

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 h~5 h，置于2℃~8℃保存备用。

7.6 包被

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；样品孔每空加入25 μL样品，阴、阳对照孔每孔加入25 μL阴、阳对照，再向以上各孔中加入50 μL酶结合物，震荡混匀。

7.7 温育

在37℃条件下温育30 min (±1 min)。

7.8 洗板

将各孔的液体弃入废液桶，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。

7.9 加入底物

每孔加入50 μL显色液A和50 μL显色液B（也可显色液A、B等比例混匀后加100 μL）。

7.10 温育

在37 °C条件下温育15 min（±1 min）。

7.11 终止反应

每孔加入50 μL终止液，终止反应。。

7.12 读值

酶标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。

8 试验成立条件

阴性对照平均值 (NC \bar{X}) NC \bar{X} = (NC1+NC2)/2

阳性对照平均值 (PC \bar{X}) PC \bar{X} = (PC1+PC2)/2

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

9 结果判定

9.1 样品的计算方法 S/N= (样品/NB \bar{X})

9.2 若S/N≥0.6，样品判为抗体阴性；

9.3 若S/N<0.6，样品判为抗体阳性；

附录 A

(规范性)

塞内卡病毒重组蛋白的制备

A.1 重组表达质粒的制备及鉴定

生产用菌液繁殖将生产用细菌种子按 1:100 比例转接含 Kan⁺的 LB 液体培养基中,置 37 °C 培养至 OD_{600 nm} 值为 0.65,收集菌液,提取质粒并进行双酶切鉴定。挑取单个卡那霉素 (Kan) 抗性转化子,接种含 Kan 的 LB 培养基,过夜培养,用碱裂解法提取质粒。采用特异性引物进行 PBR 扩增,电泳鉴定扩增片段;用双酶切重组质粒,电泳检查插入片段的大小;并进行序列测定。

A.2 基因工程重组表达菌的诱导表达

将鉴定后的重组表达质粒转化 BL21(CE3)感受态细胞,利用 Kan 抗性筛选重组转化子。进行靶蛋白的诱导表达及 SCS-PAGE 分析。

A.3 可溶性重组蛋白的纯化

将 25 °C 诱导培养 4 h 的重组菌 200 mL 离心后,按约 1:10 (M/V) 的比例加入预冷的含 1 % Triton X-100, 1 mmol/L PMSF, 2 mmol/L CTT, 500 mmol/L NaCl 的 20 mL 磷酸盐缓冲液 (pH 8.0), 超声裂解、离心处理的上清经 0.22 μm 的滤器过滤后,加入 1 mL 镍亲和层析基质,装柱 4 °C 作用 30 min。依次用 10~20 倍柱床体积、含 10 mmol/L 咪唑和 20 mmol/L 咪唑, 500 mmol/L NaCl 的磷酸盐缓冲液洗涤 3 次;并用考马斯亮兰 G-250 检测试剂 (Bradford 法) 间隔检测洗脱液。再用含 100 mmol/L~500 mmol/L 咪唑的磷酸盐缓冲液洗脱含 His-tag 的重组蛋白,分管收集,洗脱流速控制在 5 ~ 7 mL/h。

SCS-PAGE 检验纯化蛋白的纯度,合并仅有目的蛋白的收集管,经分子截量 3 kD 的蛋白浓缩管 (YM-3 型, Millipore 产品) 浓缩后,4 °C 下磁力搅拌 PBS 液快速透析 4 h,收集蛋白-70 °C 保存。

附录 B

(规范性)

阴性对照和阳性对照的制备

B.1 阴性对照的制备

B.1.1 采血

对 1 头健康猪进行静脉采血。

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 1h，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

用塞内卡重组蛋白于每只塞内卡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，当抗体效价达 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“塞内卡阳性血清”，同时注明制备日期等信息。

附录 C

(规范性)

相关试剂的配制

C.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）。

C.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），再称取猪血清白蛋白 20 g，蔗糖 50 g，加入其中，搅拌溶解后，再加入 0.5 mL ProBLin-300，0.5 mL 吐温-20，搅拌混匀。

C.3 样品稀释液

称取 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9 g、 KH_2PO_4 0.2 g、NaCl 8 g、KCl 0.2 g，加入 800 mL 双蒸水搅拌溶解，加入 BSA 10 g、ProBLin300 1 mL、吐温 1 mL，用双蒸水定容至 1000 mL，过滤除菌。

C.4 25 倍浓缩洗涤液

称取 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 72.5 g、 KH_2PO_4 5 g、NaCl 200 g、KCl 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。

C.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 ProBLin 300 1 mL，而后加纯化水定容至 1000 mL，定量分装，2℃~8℃保存。

C.6 显色液 B

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

C.7 终止液

量取纯化水 876 mL，缓慢加入浓硫酸（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。