

# 团 体 标 准

T/CVMA XXXX—XXXX

## 小反刍兽疫病毒抗体间接 ELISA 检测方法

Indirect ELISA for detection of peste des petits ruminants virus antibody

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 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。

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：中国动物疫病预防控制中心、青海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、广西壮族自治区动物疫病预防控制中心、北京亿森宝生物科技有限公司、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、新疆生产建设兵团动物疫病预防控制中心、山东省动物疫病预防与控制中心。

本文件主要起草人：孙雨、宋晓晖、王传彬、刘亚涛、王睿男、蔡金山、邹联斌、杨林、孙航、王文、张旭、阚威、王新杰、孙晓明、白雪冬、陈昭旭、胡祥钰、甘平、马英、毕一鸣、党安坤、王贵升、黄辉、姚强、凌洪权、武焯、彭强、董春霞。

# 小反刍兽疫病毒抗体间接 ELISA 检测方法

## 1 范围

本文件描述了应用间接 ELISA 检测小反刍兽疫病毒抗体的方法。

本文件适用于间接 ELISA 方法检测动物血清中的小反刍兽疫病毒抗体，可以用于动态监测抗体消长变化，适用于未注射小反刍兽疫疫苗动物的检疫及评估养殖场小反刍兽疫疫苗免疫状况。

## 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（包括所有的修改单元）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 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**小反刍兽疫** *peste des petits ruminants, PPR*

由小反刍兽疫病毒引起的一种急性病毒性传染病，主要感染小反刍动物，以发热、口炎、腹泻、肺炎为特征。

### 3.2

**ELISA吸附试验** *enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA*

ELISA吸附试验是由酶分子与抗体分子共价结合形成酶标记抗体，此种结合不会改变抗体的免疫学特性，也不影响酶的生物学活性。通过此种酶标记抗体与吸附在固相载体上的抗原发生特异性结合，当加入底物溶液后，底物可在酶作用下使其所含的供氢体由无色的还原型变成有色的氧化型，从而出现显

色反应，此种显色反应可通过酶标仪进行定量测定，从而通过底物的显色反应来判定有无相应的免疫反应。

#### 4 原理

本文件应用间接 ELISA 原理，在酶标板上包被小反刍兽疫病毒重组 N 蛋白抗原，然后加入待检血清，如果待检血清中存在小反刍兽疫病毒抗体，就会与包被的 N 蛋白抗原发生反应。洗涤除去未结合的成分，再加入辣根过氧化物酶标记物，与酶标板上抗原抗体复合物发生特异性结合；再经洗涤除去未结合的辣根过氧化物酶标记物，加入底物显色液，与辣根过氧化物酶反应形成蓝色产物，显色深浅与样品中的特异性抗体含量成正相关；加入终止液终止反应后，产物变为黄色；待检血清中抗体越多，从而最终的显色反应就越深。待检血清中抗体的含量与颜色呈正比，可通过酶标仪读数的方式判定待检血清中是否有小反刍兽疫病毒抗体。

#### 5 试剂

5.1 小反刍兽疫病毒重组 N 蛋白抗原，见附录 A。

5.2 阴性对照，见附录 B.1。

5.3 阳性对照，见附录 B.2。

5.4 包被缓冲液，见附录 C.1。

5.5 封闭液，见附录 C.2。

5.6 酶稀释液，见附录 C.3。

5.7 样品稀释液，见附录 C.4。

5.8 25 倍浓缩洗涤液，见附录 C.5。

5.9 显色液 A，见附录 C.6。

5.10 显色液 B，见附录 C.7。

5.11 终止液，见附录 C.8。

#### 6 设备与耗材

6.1 酶标仪。

6.2 分析天平。

- 6.3 洗板机。
- 6.4 37℃温箱。
- 6.5 2℃~8℃冰箱，-20℃冰箱。
- 6.6 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）。
- 6.7 多道移液器（300μL）。
- 6.8 酶标板。
- 6.9 血清稀释板：96孔一次性U型血凝板或96孔细胞培养板。
- 6.10 一次性注射器（5mL~10mL）。

## 7 操作步骤

### 7.1 样本采集及处理

采集静脉血时，每只羊使用一个注射器。建议进行静脉无菌采血，不少于2 mL。室温静置于斜面2h，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。

### 7.2 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。

### 7.3 包被酶标板

使用包被缓冲液将小反刍兽疫病毒重组N蛋白稀释至5.6μg/mL。包被酶标板，每孔加100 μL。置于2~8℃包被16h。

### 7.4 洗板

弃去包被缓冲液，每孔加入280~300 μL的洗涤液，洗板5次。

### 7.5 封闭

每孔加入250 μL封闭液，置于37℃封闭4 h。

### 7.6 洗板

弃去封闭液，每孔加入280~300 μL的洗涤液，洗板2次，弃去洗涤液，并在吸水纸上拍干。

### 7.7 干燥

置于25℃干燥2h。装入铝箔袋，加干燥剂，抽真空，置于2℃~8℃保存备用。

### 7.8 样品稀释准备

用样品稀释液50倍稀释待检样品（例如：4μL样品加196μL样品稀释液）。

### 7.9 加样

取出包被板，所有检测孔中加入100μL稀释好的样品。阴性对照、阳性对照不稀释，每孔加入100μL。对照孔重复两孔，振荡混合均匀。

### 7.10 温育

置37℃恒温培养箱中温育30分钟（±1分钟）。

### 7.11 洗板

将各孔的液体弃入废液筒，用280 μL（±20μL）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。

### 7.12 加酶标记物

用酶稀释液将辣根过氧化物酶标记的兔抗羊IgG按1:2000进行稀释，每反应孔加入100 μL。

### 7.13 温育

置37℃恒温培养箱中温育30分钟（±1分钟）。

### 7.14 洗板

将各孔的液体弃入废液桶，用280 μL（±20μL）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。

### 7.15 加入显色液

每孔分别加入50μL显色液A和50μL显色液B。

### 7.16 静置和反应终止

37℃恒温培养箱中温育15分钟。每孔加入终止液50μL。

### 7.17 读值

酶标仪测量并且记录样品和对照的OD值(450nm)，15min内读值有效。

## 8 结果判定

### 8.1 成立标准

阴性对照平均值 (NC )       $NC = (NC1 + NC2) / 2$

阳性对照平均值 (PC )       $PC = (PC1 + PC2) / 2$

试验成立判断标准:  $PC - NC \geq 0.5$ ,  $NC \leq 0.2$ 。

### 8.2 判定标准

样品的计算       $S/P = \text{样品} / PC$

如果  $S/P$  值  $< 0.2$ , 样品应判定为抗体阴性。

如果  $S/P$  值  $\geq 0.2$ , 样品应判定为抗体阳性。

## 附录 A

(规范性)

## 小反刍兽疫病毒重组 N 蛋白抗原的制备

## A.1 生产用菌液繁殖

分别将生产用菌种种子 pET-30a-(N)-BL21(DE3) 按 1:100 比例转接含卡那霉素 (100 $\mu$ g/mL), 置 37 $^{\circ}$ C 培养至 OD<sub>600nm</sub> 值为 0.6, 收集菌液。

## A.2 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/mL, 16 $^{\circ}$ C 下继续诱导 12 小时, 收集诱导表达菌液。

## A.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 8000r/min 离心 10 分钟, 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 8000r/min 离心 10 分钟, 用 6ml PBS (0.01 mol/L, pH 值 7.4) 重悬菌体沉淀, 在 150W 功率的超声波的作用下冰浴裂解, 有效时间为 10 分钟, 工作时间为 5 秒, 间隔 5 秒。将超声裂解物在 2~8 $^{\circ}$ C、以 12000r/min 离心 15 分钟, 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 (8kd) 浸泡在 2L 的透析液中, 过夜透析, -70 $^{\circ}$ 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 头健康羊进行颈部静脉大量采血。

B.1.2 制备血清 室温 (15~25°C) 待血液凝固后, 37°C 静置 2 小时后, 然后 2~8°C 静置 1 小时, 将析出的血清转移到离心瓶中, 以 2000r/min 离心 5 分钟, 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 $\mu$ m 滤膜过滤除菌, 无菌定量分装, 1mL/瓶, 置-20°C 以下保存, 标记为“小反刍兽疫阴性对照血清”, 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 用小反刍兽疫疫苗于每只小反刍兽疫抗体阴性羊耳背后肌肉注射, 2mL / 头份。免疫后 1 周, 每周无菌采血检测, 当抗体效价达 1: 512 时, 无菌采集免疫羊血液。

B.2.2 血清的分装及保存 将制备的血清混合均匀后, 经 0.22 $\mu$ m 滤膜过滤除菌, 无菌定量分装, 1mL/瓶, 置-20°C 以下保存, 标记为“小反刍兽疫阳性对照血清”, 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  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1.59g、 $\text{NaHCO}_3$  2.93g，加入 800mL 灭菌纯化水搅拌溶解，加灭菌纯化水定容至 1000mL，调 PH 值 9.6~9.8，2~8℃保存。

## C.2 封闭液

称取  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.9g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2g、 $\text{NaCl}$  8g、 $\text{KCl}$  0.2g，加入 800ml 灭菌纯化水搅拌溶解，再加入 BSA 5g，再加入 0.5mL ProClin 300，0.5mL 吐温 20，灭菌纯化水定容至 1000mL，调 PH 值 7.2~7.4，2~8℃保存。

## C.3 酶稀释液

称取  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.9g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2g、 $\text{NaCl}$  8g、 $\text{KCl}$  0.2g，加入 800mL 灭菌纯化水搅拌溶解，再加入 BSA 20g，再加入 1 mL ProClin 300，1 mL TrionX 100，灭菌纯化水定容至 1000mL，调 PH 值 7.2~7.4，过滤除菌，2~8℃保存。

## C.4 样品稀释液

称取  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.9g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2g、 $\text{NaCl}$  8g、 $\text{KCl}$  0.2g，加入 800mL 灭菌纯化水搅拌溶解，再加入 BSA 20g，再加入 1 mL ProClin 300，1 mL 吐温 20，灭菌纯化水定容至 1000mL，调 PH 值 7.2~7.4，过滤除菌，2~8℃保存。

## C.5 25 倍浓缩洗涤液

称取  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  72.5g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5g、 $\text{NaCl}$  200g、 $\text{KCl}$  5g，加入 800mL 灭菌纯化水搅拌溶解，

再加入 1 mL ProClin 300、25mL 的吐温 20，加灭菌纯化水定容至 1000mL，过滤除菌，2~8℃保存。  
使用前将 25 倍浓缩洗涤液用蒸馏水或去离子水 25 倍稀释，即 1 份 25 倍浓缩洗涤液加 24 份蒸馏水。例如：40mL25 倍浓缩洗涤液加入 960mL 蒸馏水。

#### C. 6 显色液A

称取柠檬酸 5.76g、过氧化脲 0.5g、乙酸钠 6.21g，加入 800mL 灭菌纯化水搅拌溶解，再加入 ProClin 300 0.5mL，而后加纯化水定容至 1000mL，过滤除菌，2~8℃保存。

#### C. 7 显色液B

称取柠檬酸 5.76g、TMB 0.2g，加入甲醇 100mL 溶解，再加入 ProClin 300ml 0.5mL，最后加灭菌纯化水定容至 1000mL，过滤除菌，2~8℃保存。

#### C. 8 终止液

量取纯化水 800mL，缓慢加入浓硫酸（18.4mol/L）27.2mL，搅拌均匀，而后加灭菌纯化水定容至 1000mL，2~8℃保存。

---