

# 团 体 标 准

T/CVMA 215—2025

## 口蹄疫非结构蛋白 3ABC 时间分辨荧光免疫 层析抗体检测方法

TRFIA for detection of antibodies against FMDV 3ABC protein

2025 - 2 - 14 发布

2025 - 2 - 14 实施

中国兽医协会 发布

中国兽医协会  
CVMA  
全国动物卫生大会

## 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、洛阳现代生物技术研究有限公司、甘肃省动物疫病预防控制中心、云南省畜牧兽医科学院、广西壮族自治区动物疫病预防控制中心、西藏自治区动物疫病预防控制中心、洛阳莱普生信息科技有限公司。

本文件主要起草人：孙雨、宋晓晖、信爱国、李玉婉、师丽刚、王睿男、肖颖、蔡金山、阚威、王庆云、马晓艳、甘平、巨金铃、胡冬梅、孙航、原小燕、孙航、邹联斌、韦正吉、曹丽萍、李晓霞、毕一鸣、蒋菲、耿玉静、李鹏昊、肖开提、阿不都克里木。

中国兽医协会  
CVMA  
全国动物卫生大会

# 口蹄疫病毒非结构蛋白 3ABC 时间分辨荧光免疫层析抗体检测方法

## 1 范围

本文件规定了口蹄疫病毒非结构蛋白3ABC时间分辨荧光免疫层析抗体检测方法的试剂与耗材、技术原理、实验前准备、操作步骤、结果计算、试验成立条件及结果判定等内容。

本文件适用于检测猪、牛、羊全血或血清中的口蹄疫病毒非结构蛋白3ABC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。

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**时间分辨荧光免疫层析技术** Time resolved fluorescence immunochromatographic assay; TRFIA

以时间分辨荧光微球作为示踪物，将抗原抗体固定在硝酸纤维素膜上，通过层析来呈现免疫反应结果的一种新型免疫分析技术。

## 4 技术原理

采用时间分辨荧光免疫层析技术和双抗原夹心法相结合，检测口蹄疫病毒非结构蛋白3ABC抗体。通过样品与荧光微球标记物沿层析膜移动，样品中口蹄疫病毒非结构蛋白3ABC抗体与荧光微球标记物、检测线（T线）上的抗原结合而产生荧光信号值（T值），荧光微球标记物继续移动与质控线（C线）上的抗体结合产生荧光信号值（C值），荧光信号通过仪器收集转换，计算出T/C值即为待检样品口蹄疫病毒非结构蛋白3ABC抗体值。

## 5 试剂与耗材

5.1 口蹄疫病毒非结构蛋白 3ABC 时间分辨免疫荧光层析抗体检测卡，按照附录 A 制备。

5.2 相关试剂的配制，按照附录 B 准备。

5.3 便携式免疫荧光分析仪及配套 ID 卡，能在荧光检测波段 365/610 nm 条件下检测，按照附录 C 操作。

5.4 微量毛细采样管（10 μL）。

5.5 微量移液器（量程：10 μL、20 μL、200 μL）。

5.6 注射器（5 mL）。

## 6 样品

### 6.1 样品的采集与处理

按照NY/T 541中的规定进行全血或血清样品的采集与处理，并做好个人防护。

### 6.2 血清样品的采集与处理

按照NY/T 541中规定进行样品的采集与处理。若需长时间保存，应将血清置-20℃以下保存，且应避免反复冻融。

### 6.3 全血样品的采集与处理

按照NY/T 541中规定进行全血样品的采集与处理。运输时注意冷藏，确保样品清亮无污染。

## 7 操作步骤

### 7.1 取检测卡

将口蹄疫病毒非结构蛋白3ABC时间分辨免疫荧光层析抗体检测卡放于平整、洁净的台面上，恢复至室温。

### 7.2 样品稀释

将微量毛细采样管取10 μL全血或血清样品按照1:10比例加入到样品稀释液中混匀，稀释后的样品应在1 h内完成检测。可按照以下两种方式稀释：

- a) 离心管稀释：将检测样品在1.5 mL离心管中做10倍稀释并混匀。
- b) 稀释板稀释：将检测样品在稀释板上做10倍稀释并混匀。

### 7.3 加样及孵育

用移液枪吸取稀释好的样品 100 μL 到加样孔内，室温下静置反应 15 min。

### 7.4 仪器检测读数

读数前先将产品配套 ID 卡插入便携式荧光免疫分析仪，之后将完成反应的检测试纸加样孔朝里插入便携式荧光免疫分析仪，点击“快速检测”进行读数。超过 25 min 的检测结果无效。

## 8 试验成立条件

当仪器完成读值后，如果“检测值”项显示“无效”，说明质控线或检测线荧光信号值不正常，则实验不成立，需重新检测。

如果“检测值”项显示数值，说明质控线和检测线荧光信号值正常，则实验成立。

## 9 结果判定

当检测值 $<0.1$ 时，判为口蹄疫病毒非结构蛋白 3ABC 抗体阴性。

当检测值 $\geq 0.1$ 时，判为口蹄疫病毒非结构蛋白 3ABC 抗体阳性



## 附录 A

(规范性)

## 口蹄疫病毒非结构蛋白 3ABC 荧光微球抗体检测卡的制备

## A.1 口蹄疫病毒非结构蛋白 3ABC 的制备

## A.1.1 生产用菌液繁殖

用接种环挑取-70℃保存的 pKG-3ABC-E.coli 菌株划线于含 30 µg/mL 卡那霉素抗性的 LB 固体培养基, 37℃ (±2℃) 温箱倒置培养 12 h~16 h。挑取单菌落, 接种于 1 mL LB 液体培养基 (含 30 µg/mL 卡那霉素), 在 37℃ (±2℃) 条件下、以 200 r/min 振荡培养 8 h~12 h。

## A.1.2 重组蛋白的诱导表达

将菌液以 1% 的接种量转接至 LB 液体培养基 (含 30 µg/mL 卡那霉素), 在 37℃ (±2℃) 条件下, 以 200 r/min 振荡培养至 OD<sub>600 nm</sub> 值达到 0.6 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.75 mmol/mL, 16℃ 下继续诱导 12 h, 收集诱导表达菌液。

## A.1.3 3ABC 蛋白的提取

收集上述诱导表达菌液, 在 4℃ 条件下、以 5000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 菌体用结合缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L 咪唑, 0.5 mol/L 氯化钠) 重悬混匀。重悬后的菌液于冰浴中进行超声裂解 (设置功率为 300 W, 工作时间 3 s, 间歇时间 4 s, 总时间 30 min)。取上述裂解完成的菌液, 在 4℃ 条件下, 以 5000 r/min 离心 10 min, 上清液即为纯化前的重组 3ABC 蛋白。

## A.1.4 3ABC 蛋白的纯化

取超声裂解后的上清液, 经 0.22 µm 滤膜过滤, 采用 AKTA 蛋白纯化系统纯化 3ABC 蛋白, 纯化后的产物即为生产用重组蛋白, 无菌定量分装, -70℃ 以下保存。

## A.2 荧光微球垫的制备

## A.2.1 荧光微球标记口蹄疫病毒非结构蛋白 3ABC 的制备

## A.2.1.1 洗涤

按需量取固体含量为 1% 的荧光微球分散液, 加入 5 倍体积的硼酸盐缓冲液 (0.05 mol/L, pH 值为 8.0), 以 12000 r/min 离心 15 min, 弃去上清液, 重复清洗 2 次, 将洗涤后的荧光微球重悬于 5 倍体积硼酸盐缓冲液中。

## A.2.1.2 荧光微球活化

取 50 µL 荧光微球加入 1 mL MES (2-吗啉乙磺酸) 缓冲液中, 混匀, 12000 r/min 离心 15 min; 弃去上清液, 加入 1 mL MES 缓冲液, 混匀离心; 再重复上述步骤 2 次, 并用 1 mL MES 缓冲液复溶; 向上述溶液中加入 250 µL EDC 缓冲液, 混匀, 室温反应 30 min; 弃去上清液, 加入 4 mL MES 缓冲液, 混匀。

## A.2.1.3 荧光微球标记

将制备的口蹄疫病毒非结构蛋白 3ABC 加入到已活化的荧光微球中, 使其终浓度为 8 µg/mL, 充分混匀。将混匀后含口蹄疫病毒非结构蛋白 3ABC 的荧光微球溶液, 于室温 (15℃~25℃) 条件下, 避

光反应 1.5 h，于室温（15 °C ~ 25 °C）避光反应 1.5 h；按溶液总体积的 3% 加入封闭液，混匀，于室温（15 °C ~ 25 °C）避光反应 30 min。离心弃去上清液，按 A.2.1.1 用硼酸盐缓冲液清洗 2 次，并重悬已标记的荧光微球。以 1 % 的量加入 1 % 胭脂红色素，混匀，置 2 °C ~ 8 °C 保存备用。

#### A. 2. 1. 4 荧光微球垫的制备

待荧光微球标记口蹄疫病毒非结构蛋白 3ABC 恢复至室温（15 °C ~ 25 °C），取出玻璃纤维素膜并用辅料切条机裁切成 10 cm × 30 cm 规格。设置喷涂量为 3 μL/cm，每张玻璃纤维素膜（10 cm × 30 cm）以 1.0 cm 间隔喷涂 8 条。将完成喷涂的玻璃纤维素膜放置在干净纱窗网上，置 37 °C（±2 °C）干燥 2 h ~ 3 h，用切条机将喷涂有荧光微球标记口蹄疫病毒非结构蛋白 3ABC 的部分裁切为 0.7 cm × 30 cm 的条带，于 4 °C ~ 30 °C 密封保存备用。

### A. 3 印膜的制备

#### A. 3. 1 印膜溶液的制备

##### A. 3. 1. 1 质控线（C 线）印膜溶液

用磷酸盐缓冲液（0.05 mol/L，pH 值为 8.0）将 3ABC 抗体阳性血清稀释至 1.2 mg/mL 作为质控线（C 线）包被溶液，置于棕色玻璃瓶中，2 °C ~ 8 °C 保存备用。

##### A. 3. 1. 2 检测线印膜溶液

用磷酸盐缓冲液（0.05 mol/L，pH 值为 8.0）将口蹄疫病毒非结构蛋白 3ABC 稀释至 0.8 mg/mL 作为检测线包被溶液，置于棕色玻璃瓶中，2 °C ~ 8 °C 保存备用。

##### A. 3. 1. 3 印膜

将包被溶液分别吸至高效连续点膜机的质控线管线和检测线管线中，按 0.6 μL/cm 在硝酸纤维素膜上均匀划出质控线（C 线）和检测线（T 线），其中质控线（C 线）距硝酸纤维素膜顶端 0.8 cm（±0.1 cm）处，检测线距膜顶端 1.3 cm（±0.1 cm）处，质控线与检测线相距 0.5 cm（±0.1 cm），并在膜的开始端、末端及不均匀处作标记。

#### A. 3. 2 印膜干燥

将已划线的硝酸纤维素膜逐一放置在干净纱窗网上，忌重叠，置于干燥间进行干燥，37 °C（±2 °C）干燥 2 h 后。放入装有干燥剂的铝箔袋内，封口，贴上标签，于 4 °C ~ 30 °C 密封保存备用。

### A. 4 样品垫的制备

将 20 cm × 30 cm 的玻璃纤维素膜平铺于洁净的玻璃平板上，倾倒 20 mL 样品垫处理液至玻璃纤维素膜中央，滚轮铺匀，37 °C（±2 °C）过夜干燥，用切条机将其裁切为 2.0 cm × 30 cm，于 4 °C ~ 30 °C 密封保存备用。

### A. 5 检测卡的制备

#### A. 5. 1 制备环境

在室温（15 °C ~ 25 °C）及湿度 ≤ 30 %RH 的洁净环境下，按照以下步骤组装半成品试纸。

#### A. 5. 2 贴条

依次按吸水垫、包被膜、荧光微球垫、样品垫的顺序将各中间制品粘贴于 PVC 底板上，保证各中间品在相邻处均有 1 mm ~ 2 mm 层叠，并使印膜上的检测线靠近样品垫一侧、质控线靠近吸水垫一侧。

#### A.5.3 切条

在室温（15 °C ~ 25 °C）及湿度 $\leq 30\%RH$ 条件下，将已组装好的荧光微球大板修剪整齐后，用切条机将检验合格的半成品裁切为 3.0 mm ( $\pm 0.1$  mm) 宽的试纸。

#### A.5.4 装卡

挑取印膜无划痕、无污染，边缘整齐的试纸，将试纸装入卡壳中，使用压卡机进行压卡，单卡与干燥剂、滴管装入铝箔袋并封口。

附 录 B  
(规范性)  
相关试剂的配制

**B.1 样品稀释液 (0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液, pH 值为 7.2)**

称取 3.0 g 磷酸氢二钠 (含 12 个结晶水)、0.5 g 磷酸二氢钾、8.0 g 氯化钠、0.5 g 氯化钾, 溶于 800 mL 纯化水, 再加入 400  $\mu$ L Proclin-300, 纯化水定容至 1 L。

**B.2 样品垫处理液**

称取 17 g 无水磷酸氢二钠, 0.414 g 磷酸二氢钠 (含 2 个结晶水), 5.0 g 蔗糖, 3.0 g 酪蛋白, 5.0 g 聚乙二醇 20000, 5.0 g 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP-K30), 20 mL 吐温-20, 加入 1 L 纯化水溶解。

**B.3 硼酸盐缓冲液 (0.05 mol/L, pH 值为 8.5)**

称取 6.7 g 硼酸, 13.4 g 硼砂 (含 10 个结晶水), 溶解于 800 mL 纯化水, 定容至 1 L, 调节 pH 至 8.5。

**B.4 EDC 缓冲液**

称取 0.2 g EDC (1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐), 加入 100 mL 纯化水充分搅拌溶解后, 置 2  $^{\circ}$ C ~ 8  $^{\circ}$ C 保存备用。

**B.5 MES (2-吗啉乙磺酸) 缓冲液**

称取 2.0 g 吗啉乙磺酸 (MES), 溶解于 800 mL 纯化水, 定容至 1L, 调节 pH 值至 6.0, 置 2  $^{\circ}$ C ~ 8  $^{\circ}$ C 保存备用。

**B.6 封闭液**

称取 90 g 酪蛋白, 加入 1 L 纯化水溶解, 2  $^{\circ}$ C ~ 8  $^{\circ}$ C 保存。

**B.7 1% 胭脂红色素**

称取 1.0 g 胭脂红色素, 100 mL 纯化水溶解。

**B.8 磷酸缓冲液 (0.05 mol/L, pH 值为 8.0)**

甲液 (0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液): 称取 2.84 g 磷酸氢二钠加纯化水定容至 100 mL; 乙液 (0.2 mol/L 磷酸二氢钠溶液): 称取 3.12 g 磷酸二氢钠 (含 2 个结晶水) 加纯化水定容至 100 mL; 分别量取甲液 94.7 mL 和乙液 5.3 mL, 混匀后量取 25 mL 加入 75 mL 纯化水, 混匀。

附录 C  
(资料性)  
便携式免疫荧光分析仪及配套 ID 卡

C.1 ID 卡准备

将检验项目信息（项目名称、编号、临界值等）录入 ID 卡。

C.2 检测前准备

检查便携式免疫荧光分析仪电源显示正常。点击分析仪开关，将其打开，进入检测界面后，将产品配套 ID 卡插入相应插孔。

C.3 检测

C.3.1 检测读值

待检样品加入检测卡计时 15 min 后，将检测卡加样孔端插入仪器检测插孔中，点击仪器界面中的“快速测试”，确认待检项目信息无误后，再次点击“快速测试”，仪器开始读值。

完成读值后，仪器界面显示检测结果：“检测项目”、“检测值”、“结论”。

C.3.2 结果处理

结果如需上传或打印，点击仪器界面下端上传或打印。

---