

# 团 体 标 准

T/CVMA 312—2025

## ○ 型口蹄疫病毒抗体镧系荧光免疫层析法

Lanthanide fluorescence immunochromatographic assay for detection of antibody against foot and mouth disease virus type 0

2025 - 11 - 11 发布

2025 - 11 - 11 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。

本文件涉及专利。

本文件由四川省动物疫病预防控制中心提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：四川省动物疫病预防控制中心、成都微瑞生物科技有限公司、中国农业科学院兰州兽医研究所、新疆维吾尔自治区动物卫生监督所（自治区动物疫病预防控制中心）。

本文件主要起草人：周明忠、陈斌、常慧云、李春、章健、吴宣、陈涛云、张永光、邵军军、陈弟诗、阳爱国、徐蜜、裴超信、张毅、李丽、蔡冬冬、刘亚涛、古丽曼·木哈买提拜、李舵、居马别克·夏拉巴依、任娟、王泽洲。

## 引 言

本文件的发布机构提请注意，声明符合本文件时，可能涉及到条目 5、7、9、10、附录 A 和附录 B 相关的专利的使用。

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承诺，他愿意同任何申请人在合理且无歧视的条款和条件下，就专利授权许可进行谈判。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：成都微瑞生物科技有限公司

地址：四川省成都市高新西区科新路 6 号

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专利的责任。

# O型口蹄疫病毒抗体镧系荧光免疫层析法

## 1 范围

本文件规定了O型口蹄疫病毒抗体镧系荧光免疫层析法的原理、试剂与耗材、仪器设备、样品准备、操作步骤、结果判定及废弃物处理等内容。

本标准适用于检测牛、羊、猪血清中O型口蹄疫病毒抗体。

## 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。

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

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件

### 3.1

**镧系荧光免疫层析技术** Lanthanide fluorescence immunochromatographic assay; LFICA

是以镧系荧光微球作为抗原的示踪物，同时将抗体固定在硝酸纤维素膜上，通过层析技术来实现抗原-抗体特异性免疫反应的一种新型免疫层析技术。

## 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BSA: 牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin)

FMDV: 口蹄疫病毒 (Foot and mouth disease virus)

NC膜: 硝酸纤维素膜 (Nitrocellulose membrane)

PVC: 聚氯乙烯塑料材料 (Polyvinyl chloride)

## 5 原理

该检测基于双抗原夹心法原理。血清中的O型口蹄疫病毒抗体与镧系荧光微球标记的O型口蹄疫病毒复合抗原结合，形成抗原-抗体免疫复合物。复合物在层析过程中被T线包被的O型口蹄疫病毒抗体特

异融合抗原捕获并形成双抗原夹心复合物；未结合的标记物被C线上的O型口蹄疫病毒阳性血清抗体捕获。镧系荧光层析仪测定T线和C线荧光信号值（T/C比值），通过标准曲线计算抗体效价。

## 6 试剂和耗材

- 6.1 重组口蹄疫病毒 O 型多表位抗原，制备方法见附录 A。
- 6.2 O 型口蹄疫病毒荧光微球抗体检测卡，制备方法见附录 B。
- 6.3 相关试剂，配制方法见附录 C。
- 6.4 O 型口蹄疫病毒标准阳性血清，制备方法见附录 D。

## 7 仪器设备

- 7.1 可调单道移液器（0.5  $\mu\text{L}$  ~ 10  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{L}$  ~ 100  $\mu\text{L}$ ）。
- 7.2 注射器（5 mL）。
- 7.3 离心机（最大离心力 15000 r/min）。
- 7.4 2  $^{\circ}\text{C}$  ~ 8  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱，-20  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。
- 7.5 便携式镧系荧光分析仪，操作方法见附录 E。
- 7.6 电子天平（精确度为 0.1 g）。

## 8 样品的采集与保存

### 8.1 样品的采集与处理

按照 NY/T 541 规定进行样品的采集和处理。无菌注射器静脉采血，不少于 3 mL，用自然析出法分离血清后，置于无菌血清管中。血清清亮，无溶血，无污染。

### 8.2 血清样品的保存与运输

按照 NY/T 541 规定进行血清样品的存放与运输。血清样品置 2  $^{\circ}\text{C}$  ~ 8  $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。若超过一周检测，置于-20  $^{\circ}\text{C}$ 以下冷冻保存。

## 9 检测方法

### 9.1 样品稀释

将待检血清样品用样品稀释液按 1:50 进行稀释。

### 9.2 加样

取出 O 型口蹄疫病毒抗体镧系荧光免疫层析检测卡，置于水平和干净的桌面上，用移液器吸取已稀释好的检测样品，垂直滴加 80  $\mu\text{L}$  于加样孔内。

### 9.3 检测

避光置于室温作用 15 min 后，将检测卡放入便携式镧系荧光分析仪检测。分析仪通过 LED 灯激发并收集检测线（T 线）和质控线（C 线）上的荧光信号，分析仪将荧光信号值转换成数值（T 线和 C 线），由 T、C 荧光信号值转换成样品中 O 型口蹄疫病毒抗体检测值。

## 10 结果判定

### 10.1 试验成立条件

当仪器完成读值后，如果检测值显示“无效”，说明仪器未检测到荧光信号。则实验不成立，应重新检测。

如果检测值显示数值，说明质控线和检测线荧光信号值正常，则实验成立。

### 10.2 结果判定

当检测值  $< 8$  时，判为 O 型口蹄疫病毒抗体阴性；当检测值  $\geq 16$  时，判为 O 型口蹄疫病毒抗体阳性；当  $8 \leq$  检测值  $< 16$  时，判为 O 型口蹄疫病毒抗体可疑。

## 11 废弃物处理

采样和检测过程中产生的废弃物按照 GB 19489 的规定执行。

## 附录 A

(资料性)

## 重组口蹄疫病毒 O 型多表位抗原的制备

## A.1 原核重组表达载体的构建

## A.1.1 表位融合 DNA 设计合成

选用我国 O 型口蹄疫病毒代表毒株 O/MYA98/BY/2010、OS/99、O/SCGH/CHA/2016、Akesu/58、O/CHA/7/2011、O/XJBC/CHA/2017 (GenBank 登录号为: JN998085、KX161429、AJ131469、JF837375、KY696708), 将所有表位 DNA 通过间隔子 (linker) 顺序连接组装成多表位 DNA, 将其序列优化为大肠杆菌偏爱密码子序列, 为了保证 DNA 正确插入表达载体, 在 DNA 序列的两端分别引入了特异性酶切位点, BamH I 和 Xho I, 利用化学合成的方法合成 O 型口蹄疫病毒多表位蛋白融合表达目的基因序列。

## A.1.2 重组质粒的构建

用 BamH I 和 Xho I 将上述多表位 DNA 进行双酶切, 反应体系为: rCutSmart 缓冲液 5  $\mu$ L, BamH I 和 Xho I 各 2  $\mu$ L, DNA 10  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C 反应 2 h; 采用琼脂糖凝胶纯化试剂盒纯化回收目的 DNA, 然后用 T4 DNA 连接酶将其与 BamH I 和 Xho I 线性化的 pET-32a(+) 连接, 即为重组表达质粒 pET-32a-OME。反应体系为: 10 $\times$  buffer 1  $\mu$ L, OME 5  $\mu$ L, pET-32a(+) 片段 1  $\mu$ L, T4 DNA ligase 1  $\mu$ L, 无离子水 2  $\mu$ L, 总体积 10  $\mu$ L; 4 $^{\circ}$ C 连接过夜。然后将 10  $\mu$ L 连接产物加入解冻的 JM109 感受态细胞, 再补加 700  $\mu$ L 预热 (37  $^{\circ}$ C) 的 SOC 培养液, 振荡培养 1 h (220 r/min)。4000 r/min 离心 4 min, 吸弃部分上清, 留 100  $\mu$ L ~ 200  $\mu$ L 液体重悬细胞, 取适量细胞悬液接种 LB 固体培养基平板 (Amp<sup>+</sup>), 涂布均匀后予 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h ~ 16 h, 4  $^{\circ}$ C 保存。

## A.1.3 重组质粒的鉴定

从 LB (Amp<sup>+</sup>) 固体培养基平面上挑选典型的单菌落接种 LB (Amp<sup>+</sup>) 液体培养基 (5 mL), 220 r/min 振荡培养 12 h ~ 16 h (37  $^{\circ}$ C)。取 1 mL ~ 4 mL 菌液提取重组质粒 DNA, 按试剂盒说明书操作。随后对提取的重组质粒 DNA 进行双酶切鉴定。

## A.2 重组大肠埃希氏菌 pET-32a-(OME)-BL21(DE3)pLysS 株的构建

将 pET-32a-OME 连接产物转化进 BL21(DE3)pLysS 细胞中。无菌条件下, 取适量 BL21 菌液接种 LB 固体培养基平板 (Amp<sup>+</sup>), 涂布均匀, 待菌液完全吸收后, 做好标记, 倒置于 37  $^{\circ}$ C 恒温培养箱中, 静置培养 16 h。挑取单菌落进行菌液鉴定、酶切鉴定、菌液测序, 确定 OME 片段与 pET-32a(+) 载体正确重组。

## A.3 重组大肠埃希氏菌 pET-32a-(OME)-BL21 (DE3) pLysS 株的诱导表达

## A.3.1 接种与培养

取 1 mL 重组大肠埃希氏菌 pET-32a-(OME)-BL21(DE3) pLysS 株, 接种于 100 mL LB 培养基中 (Amp<sup>+</sup>), 同时用携带空质粒的 pET-32a-BL21(DE3)pLysS 株为对照组, 37  $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 2 h ~ 3 h, 至 OD<sub>600nm</sub> 值达 0.4 ~ 0.6。

## A.3.2 诱导

分别向试验组和对照组中加入终浓度为 0.4 mmol/ml 的 IPTG, 37 °C、220 r/min 培养 6 h。

### A. 3.3 菌液的收获

分别诱导后实验组和对照组菌液各 1 mL, 经于 SDS-PAGE 蛋白电泳。其余实验组样本以 4000 r/min 离心 20 min, 弃上清, 收集菌体沉淀, -20 °C 保存备用。

## A. 4 SDS凝胶电泳分析

### A. 4.1 样品的预处理

将上述 A.2.2 收集的 1 mL 样品以 4000 r/min 离心 1 min, 弃上清, 加入 5×SDS 缓冲液的 20 μL、1 mol/L DTT 的 10 μL 和 70 μL 的 PBS 重悬菌体沉淀, 沸水浴中加热 5 min, 冰浴 3 min, 10000 r/min 离心 3 min, 取上清备用。

### A. 4.2 SDS 凝胶电泳分析

分别取 A.4.1 处理后的样品各 5 μL 及蛋白分子量 Marker 进行 SDS 凝胶电泳, 考马斯亮蓝染色, 脱色后观察。

## A. 5 ELISA或化学发光检测免疫反应性

### A. 5.1 检测

用 CBS 将 OME 蛋白稀释为 0.25 μg/ml, 100 μL/孔, 4 °C 过夜包被; 用 PBST 洗 3 次, 向每孔中加入 200 μL 封闭液进行封闭, 37 °C 封闭 2 h。拍干, 于 37 °C 干燥 2 h, 装袋真空封闭, 4 °C 保存。从 4 °C 取出的化学发光板和试剂需恢复到室温备用。在 U 型稀释板中用血清稀释液将待检血清以及阴阳性对照血清做 1:20 倍稀释, 每板设置 3 个阳性对照血清和 3 个阴性对照血清。震荡混匀。将步骤 2 稀释板中的血清按次序转移至包被抗原的化学发光板中, 37 °C 反应 10 min。弃掉反应液, 每孔加入 300 μL 的稀释后的 PBST, 洗涤 4 次 ~ 6 次, 中间一次震荡洗涤 30 s ~ 60 s, 最后一次拍干。每孔加入 100 μL 辣根过氧化物酶标记的兔抗猪 IgG, 37 °C 反应 10 min。

### A. 5.2 结果测定

将化学发光 A 液和 B 液 1:1 混匀, 每孔加入 100 μL, 室温反应 5 min 后用化学发光检测仪检测化学发光值。

## A. 6 原核表达载体的构建结果

### A. 6.1 重组质粒的构建

构建出重组质粒 pET-32a-OME, 并对该重组质粒进行酶切鉴定和重组质粒外源片段序列的测定。

### A. 6.2 重组质粒的鉴定

将 pET-32a-OME 质粒用 BamH I 和 Xho I 进行双酶切鉴定, 出现一条 411 bp 左右的载体片段和目的片段大小的片段。

### A. 6.3 重组质粒外源片段序列的测定

重组质粒 pET-32a-OME 中的外源片段 OME 测序及分析。结果表明, 目的片段与设计基因序列完全一致。

#### A.7 重组大肠埃希氏菌pET-32a-(OME)-BL21(DE3)pLysS的鉴定

SDS-PAGE 分析结果：分别取试验组和对照组样品进行 SDS-PAGE 电泳。结果表明，重组大肠埃希氏菌 pET-32a-(OME)-BL21(DE3)pLysS 能诱导产生 30 kDa 的多表位 OME 蛋白。各项指标均符合标准，可以作为 O 型口蹄疫高敏荧光层析试剂盒用抗原的研究。

## 附录 B

(资料性)

### O 型口蹄疫病毒镧系荧光免疫检测卡的制备

#### B.1 免疫微球垫的制备

##### B.1.1 荧光微球标记 O 型口蹄疫重组蛋白的制备

将 O 型口蹄疫重组蛋白加入到已活化的荧光微球中,充分混匀,于室温避光反应 1.5 h;按溶液总体积的 3%加入封闭液,混匀,于室温避光反应 30 min。离心弃上清,用硼酸盐缓冲液清洗 2 次,并重悬已标记的荧光微球,2℃~8℃保存备用。

##### B.1.2 荧光微球垫的制备

把荧光微球标记 O 型口蹄疫病毒 VP1 重组蛋白稀释 5 倍后,用点膜喷金机设置喷量为 3 μL/cm,每张玻璃纤维素膜(10 cm×30 cm)以 7 mm 间隔喷涂,将喷好的荧光微球垫放置在试管架上,置 37℃干燥 2 h~3 h,烘干后于切成 7 mm 于 4℃~30℃密封保存备用。

#### B.2 包被片材的制备

##### B.2.1 包被溶液的制备

###### B.2.1.1 质控线(C线)包被溶液

用磷酸盐缓冲液(10 mM, pH 值 7.4)将 O 型口蹄疫标准阳性血清(其制备方法见附录 C)稀释至终浓度为 1.5 mg/mL 作为质控线(C 线)包被膜溶液,置于棕色玻璃瓶中,2℃~8℃保存备用。

###### B.2.1.2 检测线(T线)包被溶液

用磷酸盐缓冲液(10 mM, pH 值 7.4)将 O 型口蹄疫病毒 VP1 重组蛋白稀释至终浓度为 1.2 mg/mL 作为检测线包被溶液,置于棕色玻璃瓶中,2℃~8℃保存备用。

##### B.2.2 包被片材

首先把 NC 膜粘在 PVC 底板 NC 膜粘贴处,用连续点膜机将把包被溶液(C 线和 T 线)包被在 NC 膜上,按划线量 0.8 μL/cm 在 NC 膜上均匀划出质控线(C 线)和检测线(T 线),将已划好的 NC 膜逐一放置试管架上,37℃干燥 8 h 后,放入装有干燥剂的铝箔袋内,封口,贴上标签,于 4℃~30℃密封保存备用。

#### B.3 样品垫的制备

将 20 cm×30 cm 的玻璃纤维素膜平铺于洁净的网架上,用玻纤喷洒机将样品垫处理液均匀喷洒玻璃纤维素膜上,置于 37℃烘房过夜干燥,用切条机将其裁切为 1.7 cm×30 cm,于 4℃~30℃密封保存备用。

#### B.4 检测卡的制备

在室温及湿度≤30% RH 的洁净环境下,按照以下步骤组装半成品试纸。

##### B.4.1 贴条

依次按吸水垫、荧光微球垫、样品垫的顺序将各中间制品粘贴于包被片材 PVC 底板各个位置上（如检测试剂卡示意图），保证吸水线和荧光微球垫对 NC 膜相邻处均有 1 mm~2 mm 层叠，样品垫一边与 PVC 底板下沿对齐，并使包被片材上的检测线靠近样品垫一侧、质控线靠近吸水垫一侧。

#### B.4.2 切条

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  $3.12\text{ mm}\pm 0.1\text{ mm}$  宽的试纸。

#### B.4.3 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，检测卡示意图见图 1，检测卡与干燥剂、滴管放入铝箔袋并用多功能封口机封口。

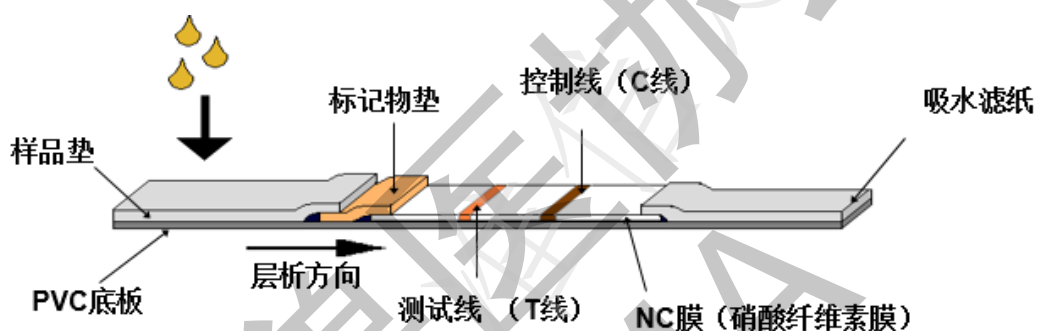


图1 0型口蹄疫病毒抗体耦系高敏荧光免疫分析法检测试剂卡示意图

附录 C  
(规范性)  
相关试剂配制

C.1 配制 0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

取 71.6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  溶于 1000 mL 双蒸水即可。

C.2 配制 0.2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

取 31.2 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  溶于 1000 mL 双蒸水即可。

C.3 配制 0.2 M PB 液

取 81 mL 0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  与 19 mL 0.2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ，混匀后分装，置  $2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$  备用。

C.4 配制 10 mM PB 液

取 50 mL 0.2 M PB 液，加水稀释至 1000 mL 即可。

C.5 配制封闭液

取 100 mL 0.2 M PB 液，加入 5 g BSA 溶解，再加水稀释至 1000 mL 即可。

C.6 配制样品工作液

取 0.85 g 氯化钠 ( $\text{NaCl}$ )、0.1 g 硫酸葡聚糖钠盐( $(\text{C}_6\text{H}_7\text{Na}_3\text{O}_{14}\text{S}_3)_n$ ):MW:40000、0.5 g 牛血清白蛋白 (BSA)，加入 100 mL 10mM PB 液中，混匀后分装，置  $2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$  备用。

附 录 D  
(规范性)

O 型口蹄疫病毒标准阳性血清的制备

D.1 免疫与采血

用 O 型口蹄疫病毒 VP1 蛋白免疫口蹄疫病毒抗体阴性猪，猪在耳背后肌肉注射，2 mL/头份。牛羊在臀部肌肉分别注射 10 mL/头份和 2 mL/头份。免疫后 1 周加强免疫一次，每周无菌采血，用口蹄疫 O 型液相阻断 ELISA 抗体检测试剂盒进行检测，当抗体效价达 1:512 时，无菌采集免疫猪血液。

D.2 分装、冻干及保存

按常规方法抽取以上免疫并检测合格的动物（猪、牛、羊）血液 2 mL ~ 5 mL 置洁净干燥的试管中，静置约 1 h 待血液凝固后于 4000 r/min 离心 10 min（也可将血液样品静置约 2 h，待血液凝固自然析出血清），分离血清。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，冷冻真空干燥，置 -70 °C 下保存，标记并注明制备日期等信息。

## 附录 E

(资料性)

## 便携式镧系荧光分析仪及云检测 APP

## E.1 云检测APP

将检验项目信息（项目名称、编号等）录入云检测 APP。

## E.2 检测前准备

检查便携式镧系荧光分析仪电源显示正常。点击分析仪开关，将其打开，进入开机状态。

## E.3 检测

## E.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，点击仪器界面按钮或者点击 APP 上检测图标，仪器开始读值。

完成读值后，云检测 APP 界面显示检测结果：“检测项目”、“检测值”。

## E.3.2 结果处理

结果自动上传系统，如需打印，在台式电脑云检测 APP 界面点击打印。