

ICS 点击此处添加 ICS 号

CCS 点击此处添加 CCS 号

T/HBAAV

河北省畜牧兽医学会团体标准

T/HBAAV XXXX—XXXX

非洲猪瘟病毒磁微粒化学发光 抗体检测方法

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

河北省畜牧兽医学会 发布

河北省畜牧兽医学会

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。

本文件由河北省畜牧兽医学会提出并归口。

本文件起草单位：河北省动物疫病预防控制中心、天津测易生物科技有限公司、石家庄市动物疫病预防控制中心、石家庄市兽用生物制品供应站、张家口市动物疫病预防控制中心、沧州市动物疫病预防控制中心、涿州市动物疫病预防控制中心。

本文件主要起草人：马宏伟、李永娟、苏晓梅、倪志广、仇国明、武革利、侯桂芳、王世超、葛辉、张倩、魏泽华、殷克勇、张斌、叶航、董晓坤、张承礼、彭科、丁子涵、王耀国、吴志国、李健坤、李晓琳、刘泽霖、严博悦、赵研、刘志昌、霍宏宇、陈锡俊、孙伟珊，赵秀英，曹琪，董建伟。

非洲猪瘟病毒磁微粒化学发光抗体检测方法

1 范围

本标准规定了非洲猪瘟病毒磁微粒化学发光抗体检测方法的技术原理、试剂与耗材、仪器设备、操作步骤、结果判定。

本标准适用于定性检测猪血清中的非洲猪瘟病毒抗体。

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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 18648 非洲猪瘟诊断技术

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

NY/T 1948 兽医实验室生物安全要求通则

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 技术原理

采用磁微粒化学发光——竞争法原理进行检测。待测血清中的ASFV p30抗体与吲哚酯标记的ASFV单克隆抗体竞争性的结合生物素标记的ASFV p30重组蛋白抗原，同时ASFV p30重组蛋白抗原标记的生物素与磁珠上的链霉亲和素发生特异性亲和反应，形成磁珠-抗原-抗体复合物；预激发液和激发液催化该复合物上的吲哚酯发出光子，发光强度与待检血清中ASFV抗体的含量成反比。

5 试剂与耗材

5.1 磁珠工作液

含有偶联链霉亲和素磁性微粒的溶液，按照附录A制备。

5.2 抗原工作液

含有生物素标记的ASFV p30重组蛋白的溶液，按照附录B制备。

5.3 抗体工作液

含有吲哚酯标记的ASFV p30单克隆抗体的溶液，按照附录C制备。

5.4 阳性对照和阴性对照

按照附录D制备。

5.5 20×浓缩洗涤液

按照附录E中E.1制备。

5.6 稀释液

按照E.2制备。

T/HBAAV XXXX—XXXX

5.7 预激发液

按照E.4制备。

5.8 激发液

按照E.5制备。

5.9 其他相关试剂

按照E.6、E.7制备。

5.10 试剂船

适用于全自动磁微粒化学发光免疫分析仪CY-918、CY-968、CY-3000、CY-6000、CY-9000。

5.11 1.5 mL/2 mL 离心管

5.12 一次性采血器（5 mL、10 mL）

5.13 1.5 mL 无菌离心管

6 仪器设备

6.1 离心机

6.2 全自动化学发光免疫分析仪

6.3 2℃~8℃冰箱

6.4 -20℃冰箱

6.5 恒温培养箱

6.6 专用样品架

6.7 可调单道移液器（20 μL~200 μL, 100 μL~1000 μL）

6.8 电子天平

7 试验前准备及样品检测

7.1 样品采集、保存与运输

按照《兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范》（NY/T 541）进行。

检测前样品处理应在BSL-II级生物安全柜中操作，处理过程应符合生物安全规定。

样品保存和运输时，确保有效按照《兽医实验室生物安全要求通则》（NY/T 1948）进行样品的生物安全标识。

7.2 样品准备

将待检样品从2℃~8℃或-20℃冰箱取出，静置至室温。

7.3 溶液配制

洗涤液：将20×浓缩洗涤液用无离子水或蒸馏水1:20倍稀释，装入洗涤液桶。

无离子水或蒸馏水均应符合GB/T 6682的要求。

7.4 仪器准备

参照磁微粒化学发光仪器系统操作说明，按设定的反应程序设置仪器参数，放置反应杯，扫描含有

本方法反应程序、标准曲线、校准品信息的二维码并导入仪器系统，放置底物和系统维护液，开机自检，待仪器自检、系统维护完成后，方可进行样品检测。

7.5 试剂准备

将磁微粒工作液、抗原工作液、抗体工作液分别装入试剂船上的对应试剂瓶中，将磁微粒吹打混匀，试剂瓶盖换为胶盖；将试剂船装入试剂仓中。

7.6 样品检测

取待检样品于 1.5 mL/2 mL 离心管中（样品量需 300 μ L 以上），置于专用样品架，设置测试样品信息，进行检测。

整个检测过程在全自动化学发光免疫分析仪上进行，具体检测过程如下：

a) 免疫反应：取 25 μ L 待测样品，20 μ L 磁微粒工作液、50 μ L 抗体工作液、50 μ L 抗原工作液，分别加入反应杯中，37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min；

b) 清洗：使用磁铁吸附磁微粒 30 s，使其聚集于管壁，弃去上清液。加入 1 \times 洗涤液 300 μ L 悬浮磁微粒，混匀 30 s 后吸附磁微粒，弃去 1 \times 洗涤液。重复清洗 3 次。

c) 检测：加入化学发光底物 100 μ L 于清洗后的反应杯中，混匀 30 s 悬浮磁微粒，检测发光值 RLU。

8 结果判定

8.1 结果计算

$$PI = (\text{样品发光值} / \text{阴性对照发光值}) \times 100\%$$

8.2 试验成立条件

阳性对照平均 PI 值 $< 15\%$ ，阴性对照平均 PI 值 $> 90\%$ ，试验结果成立。

8.3 阴阳性判定依据

PI 值 $\leq 20\%$ 时，判为 ASFV 抗体阳性；PI 值 $> 20\%$ 时，判为 ASFV 抗体阴性。

附录 A
(规范性)
磁微粒工作液的制备

10 mg/mL的链霉亲和素磁珠使用稀释液稀释40倍，混匀后，无菌分装，置于2℃~8℃保存。

附录 B
(规范性)
抗原工作液的制备

在制备前，取 1 mg Biotin 平衡至室温后加入 180 μ L 超纯水，溶解混匀后，加入处理好的 ASFV p30 单克隆抗体 13.5 mg，充分混匀后室温静置 60 min。向超滤管中加入偶联液，PBS 补齐至管顶的白线，12000 rpm，4 $^{\circ}$ C 离心 10 min，弃掉废液，PBS 洗三次，回收偶联液。将回收的偶联液转移至干净的离心管中，然后加入等体积甘油，记录终体积及终浓度，贴好标签，置于-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

附 录 C
(规范性)
抗体工作液的制备

取 7.89 mg 处理好的 (CB 溶液溶解, 2 mg/mL) ASFV p30 单抗, 加入 2 mg/mL 的吡啶酯工作液 180 μ L, 充分混匀, 室温静置 60 min。按照总体积 1% 的比例添加 10% 甘氨酸, 充分混匀, 室温静置 10 min, 终止反应。向超滤管中加入偶联液, PBS 补齐至管顶的白线, 12000 rpm, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 弃掉废液, PBS 洗三次, 回收偶联液。按 85% 的回收率计算质量。要求浓缩后的浓度在 2 mg/mL~4 mg/mL 范围内。将回收的偶联液转移至干净的离心管中, 然后加入等体积甘油, 记录终体积及终浓度, 贴好标签, 置于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

附录 D
(规范性)
阳性对照和阴性对照的制备

D.1 阳性对照的制备

D.1.1 ASFV p30 重组蛋白的制备

取新鲜培养的工程菌种 BL21-ASFV-p30 按 1:100 接菌量接种 LB 培养液(含 100 μ g/mL 卡那霉素), 在 37 $^{\circ}$ C 条件下, 以 220 rpm 振荡至 OD_{600 nm} 值为 0.6~0.8 时, 加入 IPTG 至终浓度 0.1 mmol/L, 37 $^{\circ}$ C 条件下诱导表达 5 h 后收集菌液。将收集的菌液置 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C、以 6000 rpm 离心 10 min, 收集 BL21-ASFV-p30 菌体, PBS 重悬洗涤 3 次后, 置冰浴进行超声破碎, 以悬液趋于透明, 吹吸时无明显凝块为度。将上述裂解物置 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C、12000 rpm 离心 10 min, 收集包涵体沉淀, 将包涵体沉淀用 Binding Buffer 混匀重悬, 冰浴 1 h, 尽量使包涵体能够完全充分溶解。平衡柱子: 将镍柱填料加入到层析柱中, 填料中的乙醇用去离子水冲洗干净; 将溶解完成的菌体沉淀, 4000 rpm, 4 $^{\circ}$ C 离心 20 min, 收集上清, 用 0.22 μ m 的滤膜过滤到平衡好的柱子中, 4 $^{\circ}$ C 过夜结合; 打开柱子阀门收集流穿液, 使用 Binding Buffer 洗涤杂蛋白, 吹打混匀后打开柱子阀门, 将流出的液体收集进行电泳分析; 使用 Elution Buffer 洗脱目的蛋白, 吹打混匀后打开柱子阀门, 将流出的液体进行收集; 经 SDS-PAGE 凝胶电泳分析, 收集含有 p30 目的蛋白的洗脱液。

用 Bradford 方法测定纯化的 ASFV p30 蛋白的浓度, 将纯化的蛋白浓度定量为 200 ng/mL, 无菌定量分装, 置于-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

D.1.2 阳性对照制备

以纯化好的 ASFV p30 重组蛋白为免疫原, 免疫 2 月龄的雌性新西兰大耳兔。首次免疫用 1 mg 重组蛋白与等量的弗氏完全佐剂乳化后背部皮下多点注射; 每两周进行一次加强免疫, 用 1 mg 重组蛋白与等量的弗氏不完全佐剂乳化后背部皮下多点注射; 第三次加强免疫后一周对大耳兔耳缘静脉采血, 用自然析出法, 3000 rpm 离心 10 min, 分离血清, 采用 GB/T 18648 中的间接 ELISA 抗体检测方法测定血清的 ASFV p30 抗体效价, 当效价 >1: 512 时, 心脏大量采集血液, 然后用 0.22 μ m 滤器过滤除菌, 加入 Proclin300, 使终浓度为 0.05% (V/V), 无菌分装, 作为阳性对照, 置于-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

D.2 阴性对照的制备

阴性对照为稀释液。其制备方法参见附录 E.2。

附 录 E
(规范性)
试剂的制备

E.1 20×浓缩洗涤液制备

将表E.1中的试剂依次加入烧杯中，加灭菌蒸馏水至600 mL，溶解混匀后，定容至1000 mL，置于2~8℃保存备用。

表 E.1 20×浓缩洗涤液配方

名称	化学分子式	CAS号	称量
磷酸氢二钠	Na ₂ HPO ₄	7558-79-4	58 g
磷酸二氢钠	NaH ₂ PO ₄	7558-80-7	5.92 g
氯化钠	NaCl	7647-14-5	170 g
吐温-20	C ₅₈ H ₁₁₃ O ₂₆	9005-64-5	10 mL

E.2 稀释液制备

按表E.2中的试剂依次加入烧杯中，加灭菌蒸馏水至600 mL，溶解混匀后，定容至1000 mL，置于2℃~8℃保存备用。

表 E.2 稀释液配方

名称	化学分子式	CAS号	称量
磷酸二氢钾	KH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	26399-70-2	0.2 g
磷酸氢二钠	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	7558-79-4	2.9 g
氯化钠	NaCl	7647-14-5	8.0 g
氯化钾	KCl	7447-40-7	0.2 g
吐温-20	C ₅₈ H ₁₁₃ O ₂₆	9005-64-5	0.5 mL
牛血清白蛋白	—	94349-60-7	10 g
蔗糖	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	57-50-1	10 g
海藻糖	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	99-20-7	30 g
ProClin 300	—	96118-96-6	2 mL

E.3 PBS制备

按表E.3中的试剂依次加入烧杯中，加入800 mL纯化水搅拌溶解，调节pH至7.4，再加纯化水定容至1000 mL，21℃，0.1 MPa高压灭菌20 min后，置于室温保存备用。

表 E.3 PBS 配方

名称	化学分子式	CAS号	称量
磷酸二氢钾	KH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	26399-70-2	0.2 g

磷酸氢二钠	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	7558-79-4	2.9 g
氯化钠	NaCl	7647-14-5	8.0 g
氯化钾	KCl	7447-40-7	0.2 g

E.4 预激发液

含有0.125%~1%的二甲基甲酰胺（C₃H₇N₀，CAS号：68-12-2）或乙醇（C₂H₆O，CAS号：64-17-5）和0.125%~1%吐温-20（C₅₈H₁₁₃O₂₆，CAS号：9005-64-5）的H₂O₂，置于2℃~8℃保存备用。

E.5 激发液

含有0.125%~1%的二甲基甲酰胺（C₃H₇N₀，CAS号：68-12-2）或乙醇（C₂H₆O，CAS号：64-17-5）和0.125%~1%吐温-20（C₅₈H₁₁₃O₂₆，CAS号：9005-64-5）的NaOH，置于2℃~8℃保存备用。

E.6 CB溶液

称取1.59g碳酸钠（Na₂CO₃，CAS号：497-19-8）和2.93g 碳酸氢钠（NaHCO₃，CAS号：144-55-8），加纯化水至900 mL，调pH值到9.6，定容到1000mL。121℃，0.1MPa高压蒸汽灭菌20min后，置于室温保存备用。

E.7 10%甘氨酸

称取100 g甘氨酸（C₂H₅N₀₂，CAS号：56-40-6），加纯化水至900 mL，定容到1000 mL。经0.22 μm滤器过滤，无菌分装，置于2℃~8℃保存备用。