

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

禽白血病毒抗原磁微粒化学发光检测方法 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、秦皇岛市动物疫病预防控制中心、沧州市动物疫病预防控制中心、衡水市动物疫病预防控制中心、唐山市动物疫病预防控制中心、保定市动物疫病预防控制中心。

本文件主要起草人：马宏伟、张承礼、王振来、赵梦琳、刘亚伟、梁稼焯、顾文源、倪志广、杨卫军、麻润雯、刘博、常丽、岳家宝、王童、曹源、袁方、王小月、孙月川、陈彦丽、苏晓梅、许玲涵、杨海娟、吴志国、陈锡俊，孙伟珊，赵秀英，曹琪，董建伟。

禽白血病病毒抗原磁微粒化学发光检测方法

1 范围

本标准规定了禽白血病病毒抗原磁微粒化学发光检测方法的技术原理、试剂与耗材、仪器设备、试验前准备及样品检测、结果判定等。

本标准适用于磁微粒化学发光检测方法定性检测血清、蛋清、泄殖腔拭子、胎粪等样品中禽白血病病毒抗原。

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

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——双抗体夹心法原理进行检测。标记ALV p27鼠单克隆抗体的生物素与磁珠上的链霉亲和素发生特异性亲和反应，同时待测样品中的ALV抗原，与生物素标记的ALV p27鼠单抗结合，加入吖啶酯标记的ALV p27兔多抗后，形成磁珠-抗体-抗原-吖啶酯标记多抗复合物；化预激发液和激发液催化该复合物上的吖啶酯发出光子，发光强度与待检血清中ALV抗体的含量成正比。

5 试剂与耗材

5.1 磁微粒工作液

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 Biotin 抗体工作液

含有生物素标记的 ALV p27 鼠单克隆抗体的溶液，按照附录 B 制备。

5.3 抗体工作液

含有吖啶酯标记的 ALV p27 兔多克隆抗体的溶液，按照附录 C 制备。

5.4 阴性对照和阳性对照

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。

5.5 样品稀释液

按照 E.2 制备。

T/HBAAV XXXX—XXXX

5.6 PBS

按照 E.3 制备。

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

适用于全自动化学发光免疫分析系统 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。

样品保存和运输时应确保样品有效按照《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

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等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、Biotin 抗体工作液、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 μL 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 50 μL 待测样品，20 μL 磁微粒工作液、50 μL 抗体工作液、50 μL Biotin 抗体工作液，分别加入反应杯中，37℃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×洗涤液 300 μL 悬浮磁微粒，混匀 30 s 后吸附磁微粒，弃去 1×洗涤液。重复清洗 3 次。

c) 检测：加入化学发光底物 100 μL 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

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

8.2 试验成立条件

阳性对照平均值 > 10 × 阴性对照平均值，试验结果成立。

8.3 阴阳性判定依据

PI 值 ≥ 20% 时，判为 ALV 抗体阳性；PI 值 < 20% 时，判为 ALV 抗体阴性。

附录 A
(规范性)
磁微粒工作液的制备

链霉亲和素磁珠 (10 mg/mL) 使用样品稀释液稀释40倍，混匀后，无菌分装，2℃~8℃保存

附 录 B
(规范性)
Biotin 抗体工作液的制备

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 ALV p27 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，-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) 禽白血病病毒单抗, 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 10min, 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, -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

将-70℃保存的 pET-32a-ALV-p27-BL21 (DE3) 菌株划线至含 50 μg/mL 氨苄霉素 LB 固体培养基, 在 37℃ 的恒温培养箱倒置培养 12 h~16 h。挑取单菌落转接于 200 mL 含 50 μg/mL 氨苄霉素 LB 液体培养基中, 置 37℃、200 rpm 摇床振荡培养 12 h 左右。当 OD_{600 nm} 达到 0.6~0.8 时, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 继续振荡培养 6 h。将诱导后菌液, 以 12000 rpm 离心 1 min 后, 收集菌体, 用 PBS (0.01 mol/L, pH 值 7.2) 重悬沉淀, 通过超声波破碎仪破碎菌体后, 在 2℃~8℃ 下, 以 12000 rpm 离心 10 min, 取上清。采用镍离子梯度亲和层析法进行纯化获得纯化的禽白血病病毒 p27 蛋白。经 SDS-PAGE 凝胶电泳分析, 收集含有 p27 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℃保存备用。

D.2 阴性对照的制备

阴性对照为样品稀释液。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	C58H113O26	9005-64-5	10 mL

E.2 样品稀释液制备

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 样品稀释液配方

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	C58H113O26	9005-64-5	0.5 mL
牛血清白蛋白	——	94349-60-7	10 g
蔗糖	C12H22O11	57-50-1	10 g
海藻糖	C12H22O11	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，再加纯化水定容至 1000 mL，经 0.22 μm 过滤，置 2℃~8℃ 保存。

表 E.3 PBS 配方

名称	化学分子式	CAS号	称量
磷酸二氢钾	$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	26399-70-2	0.2 g
磷酸氢二钠	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	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 ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$, CAS 号: 68-12-2) 或乙醇 ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$, CAS 号: 64-17-5) 和 0.125%~1%吐温-20 ($\text{C}_{58}\text{H}_{113}\text{O}_2$, CAS 号: 9005-64-5) 的 H_2O , 置于 $2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$ 保存备用。

E.5 激发液

含有 0.125%~1%的二甲基甲酰胺 ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$, CAS 号: 68-12-2) 或乙醇 ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$, CAS 号: 64-17-5) 和 0.125%~1%吐温-20 ($\text{C}_{58}\text{H}_{113}\text{O}_2$, CAS 号: 9005-64-5) 的 NaOH , 置于 $2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$ 保存备用。

E.6 CB溶液

称取 1.59 g 碳酸钠 (Na_2CO_3 , CAS 号: 497-19-8) 和 2.93 g 碳酸氢钠 (NaHCO_3 , CAS 号: 144-55-8), 加纯化水至 900 mL, 调 pH 值到 9.6, 定容到 1000 mL。121 $^\circ\text{C}$, 0.1 MPa 高压蒸汽灭菌 20 min 后, 置于室温保存备用。

E.7 10%甘氨酸

称取 100 g 甘氨酸 ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$, 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 $2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$ 保存备用。