

## 深圳市标准化指导性技术文件 准

SZDB/Z 129—2015

---

### 蓝舌病病毒抗体检测 竞争酶联免疫吸附法

Detection of antibody against Bluetongue virus Competitive  
immunoenzymatic assay

2015-02-27 发布

2015-03-01 实施

---

深圳市市场监督管理局 发布



## 目次

前言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 检测原理.....	1
4 缩略语.....	1
5 试剂和材料.....	2
6 主要器械和设备.....	2
7 BTV VP7重组蛋白抗原的制备.....	2
8 BTV VP7蛋白特异性单克隆抗体的制备.....	4
9 样品采集和处理.....	5
10 竞争酶联免疫吸附试验抗体检测方法.....	5
11结果判定.....	6
附录A(规范性附录) 溶液配方 .....	8

## 前言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由检验检疫科学研究院提出。

本标准起草单位：深圳市检验检疫科学研究院、深圳出入境检验检疫局动植物检验检疫技术中心。

本标准起草人：杨俊兴、花群义、孙洁、刘建利、林庆燕、吕建强、曹琛福、曾少灵、阮周曦、张彩虹、陶虹、陈兵、叶奕优、黄超华、冯倩、卢体康、廖立珊、唐金明。

# 蓝舌病病毒抗体检测 竞争酶联免疫吸附法

## 1 范围

本标准规定了检测蓝舌病病毒抗体的竞争酶联免疫吸附试验及试剂制备方法。

本标准适用于蓝舌病病毒抗体检测、流行病学调查和免疫监测。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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

SN/T 2123 出入境动物检疫实验样品采集、运输和保存规范

《中国兽药典》第三部附录

## 3. 检测原理

酶联免疫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。本标准中被检血清和蓝舌病病毒VP7蛋白特异性单克隆抗体先后加入已用蓝舌病病毒 VP7蛋白包被的96孔酶标板孔内，二者竞争与孔内特异性包被抗原结合，加入酶标辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG，洗涤后，然后加入底物显色。待检血清中蓝舌病病毒特异性抗体含量越高，则特异性单克隆抗体与包被抗原结合的就相对少，显色越浅；反之，显色越深。使用酶标仪测定反应物的OD<sub>450</sub>值，计算抑制百分率（PI），根据PI值判定试验结果。

## 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

AcNPV：苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒。

BT：蓝舌病。

BTV：蓝舌病病毒。

BTV VP7: 蓝舌病病毒的VP7内壳蛋白。

c-ELISA: 竞争酶联免疫吸附试验。

ELISA: 酶联免疫吸附试验。

HRP: 辣根过氧化物酶。

McAb: 单克隆抗体。

McAb-BTV VP7: 蓝舌病病毒VP7蛋白特异性单克隆抗体。

OD: 光密度。

PI: 抑制百分率。

r/min: 转速单位, 转/分。

SDS-PAGE: 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳。

## 5 试剂和材料

a) 包被液、洗涤液、稀释液、底物液、终止液, 配制方法见附录A。

b) 包被抗原为蓝舌病病毒VP7蛋白。

c) BTV VP7蛋白特异性单克隆抗体。

d) 标准血清: 蓝舌病病毒阳性血清对照品、弱阳性血清对照品、阴性血清对照品, 由世界动物卫生组织(OIE)参考实验室或中国农业部指定实验室提供。

e) 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG(羊抗鼠IgG-HRP)。

f) 96孔酶标板。

## 6 主要设备

酶标仪。

单通道、多通道可调微量移液器。

恒温箱。

ELISA洗板机。

二氧化碳培养箱。

紫外分光光度计。

超声波破碎仪。

## 7 BTV VP7重组蛋白抗原的制备

### 7.1 种毒

携带BTV VP7基因的重组杆状病毒AcNPV-BTV-VP7株，由深圳市检验检疫科学研究院动植检研究所构建、鉴定、保管和供应。

## 7.2 种毒的品质和检验

### 7.2.1 蚀斑试验测定病毒含量

7.2.1.1 用 SF-900 培养基重悬 sf9 昆虫细胞，调整细胞浓度为  $5 \times 10^5$  个细胞/mL，加入 6 孔板，2mL/孔，28℃培养 24h；用 SF-900 培养基洗涤细胞 2 次。

7.2.1.2 取 6.1 中的种毒病毒液，用 SF-900 培养基作 10 倍系列稀释，取  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$  病毒稀释液，加入 6.2.1.1 中已长成单层细胞的 6 孔板，1mL/孔；28℃孵育 1h，弃去培养板中病毒液，加入于 40℃水浴预热的含 4%琼脂糖的  $2 \times$  SF-900 培养基，28℃培养 7~10d，观察计数蚀斑。

7.2.1.3 按照病毒滴度=蚀斑数 $\times$ 病毒稀释倍数/每孔体积数进行计算；病毒含量应 $\geq 1.0 \times 10^6$  pfu/mL。

### 7.2.2 病毒表达蛋白量测定

7.2.2.1 将保存的重组杆状病毒 AcNPV-BTV VP7 种毒病毒液，按 1: 10 比例接种于长成单层的 sf9 昆虫细胞，在 SF-900 培养基中 28℃培养 96~120h，反复冻融 3 次，即为病毒液。

7.2.2.2 取 100 $\mu$  L 病毒液，加 100 $\mu$  L  $2 \times$  SDS 凝胶加样缓冲液，混匀后 100℃煮沸 5min，经 12% SDS-PAGE、考马斯亮兰染色、脱色液脱色后观察，可在 39ku 处观察到 BTV VP7 蛋白的表达条带。

### 7.2.3 表达蛋白的抗原特异性

取培养的病毒液，SDS-PAGE 电泳，用羊抗 BTV 多克隆抗体和 HRP 标记的兔抗羊 IgG 进行 Western blot 试验，在 39ku 处出现特异性反应带。与蓝舌病病毒阴性血清及其他病毒（鹿流行性出血病毒、牛瘟病毒、犬瘟热病毒、口蹄疫病毒、羊痘病毒）阳性血清分别进行 Western blot 试验时，在 39ku 处未出现特异性反应带。

## 7.3 抗原的制备、纯化及保存

### 7.3.1 病毒液制备

取生产用种毒，按 1: 10 接种于长成单层的 sf9 昆虫细胞，28℃培养 96h~120h，待出现明显细胞病变后收获病毒液。

### 7.3.2 蛋白纯化

取收获病毒液，反复冻融 3 次，以 25KHz 超声波破碎 50 次，每次 20sec，间隔 30sec，8000r/min 离心 30min，收获上清液。上清液经 35000r/min 超速离心 2h，按超速离心前体积的 1/100，用灭菌 10mmol/L PBS (pH7.2) 溶解沉淀蛋白，为纯化的抗原。

### 7.3.3 测定蛋白质浓度

用紫外分光光度计测定在 OD280nm 和 OD260nm 波长下的光吸收值，按公式  $1.45 \times OD_{280nm} - 0.74 \times OD_{260nm}$  计算抗原浓度，蛋白质浓度应  $\geq 2\text{mg/mL}$ 。

#### 7.3.4 纯净检验

按现行《中国兽药典》第三部附录要求进行检验，应无细菌、霉菌、支原体污染。

#### 7.3.5 保存及有效期

提取的蛋白抗原中加入 1%硫柳汞至终浓度为 0.01%和 Leupeptin 蛋白酶抑制剂至终浓度为  $0.5\mu\text{g/mL}$ ，分装至冻存管， $0.5\text{mL/管}$ ，真空冻干保存。冻干的抗原于  $2\sim 8^{\circ}\text{C}$  保存，有效期 12 个月。

### 8 BTV VP7蛋白特异性单克隆抗体的制备

#### 8.1 杂交瘤细胞株

分泌抗 BTV VP7 蛋白特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞系为 1F5 株(编号：SZDZZX-01)，由深圳市检验检疫科学研究院动植检所制备、鉴定、保管和供应。

#### 8.2 单克隆抗体细胞株的品质和检验

##### 8.2.1 培养特性

杂交瘤细胞在含 20%胎牛血清、1% HT 的 IMDM 培养液中，在 5%二氧化碳、 $37^{\circ}\text{C}$  条件下培养，应生长良好。用显微镜检查细胞的形态正常、均一一致。

##### 8.2.2 染色体分析

取体外培养 24 小时的杂交瘤细胞，用秋水仙素法检查染色体数，每次检查 100 个细胞，其染色体数目应为 99~104。

##### 8.2.3 杂交瘤细胞分泌抗体的稳定性

将杂交瘤细胞克隆到 24 孔培养板培养，用表达的 BTV VP7 蛋白包被酶标板、采用间接 ELISA 法检测细胞上清抗体，阳性率应为 100%，效价应不低于  $1:2^8$ 。在体外传代 10 代，抗体阳性率和效价均不应不变。

##### 8.2.4 纯净检验

按现行《中国兽药典》第三部附录要求进行检验，应无细菌、霉菌、支原体污染。

#### 8.3 单克隆抗体的制备与纯化

##### 8.3.1 杂交瘤细胞培养

取液氮中冻存的杂交瘤细胞株 1F5 复苏后，含 20%胎牛血清、1% HT 的 IMDM 培养液中，在 5%二氧化碳、 $37^{\circ}\text{C}$  条件下培养。

##### 8.3.2 BTV VP7 蛋白特异性单克隆抗体腹水制备



8.3.2.1 1F5 细胞长成单层后, 收集细胞, 1000r/min 离心 10min, 收集细胞沉淀, 用 IMDM 无血清培养基重悬浮细胞, 调整浓度至约  $1 \times 10^6$  个细胞/mL。

8.3.2.2 取上述细胞悬液, 经腹腔注射于在 7d 前已用按每只小鼠 0.3~0.5mL 腹腔接种矿物油处理过的 Balb/C 小鼠, 注射剂量为 1mL/只, 在 5~10d, 当小鼠腹腔隆起、腹部明显肿大时, 用 16 号针头采集腹水。

### 8.3.3 BTV VP7 单克隆抗体的纯化:

8.3.3.1 将腹水于 4℃ 8000r/min 离心 10min, 取上清。

8.3.3.2 利用 Protein A 柱进行纯化, 纯化后用紫外分光光度计测定蛋白浓度, 用 20mmol/L PBS (pH7.2), 稀释成 1mg/mL, 加入 1% 硫柳汞至终浓度为 0.01%。

8.3.3.3 纯化后的单克隆抗体按 500 $\mu$  L/管分装, -70℃ 冻存备用, 或冻干保存。

## 9 检测样品的采集和处理

无菌采集动物血液 3~5mL, 室温放置 1~2 h, 以 3500 r/min 离心 10 min, 分离得到血清, 将分离的血清分装为 2 管。血液采集、血清样品保存等操作可按《出入境动物检疫实验样品采集、运输和保存规范》(SN/T 2123) 进行。

## 10 酶联免疫吸附试验操作方法

### 10.1 包被

用包被液将 BTV VP7 蛋白稀释至工作浓度 (5 $\mu$  g/mL), 分别加入到 96 孔酶标板中, 100  $\mu$  L/孔, 置 4℃ 冰箱过夜。

### 10.2 洗板

取出酶标板弃去液体, 将酶标板置于 ELISA 洗板机, 用 ELISA 洗涤液洗 3 遍。

### 10.3 封闭

加入封闭液, 200 $\mu$  L/孔, 37℃ 反应 1 h。

### 10.4 洗板

按 10.2 操作。

### 10.5 加样

检测样品和阳性对照、弱阳性对照、阴性对照用稀释液作 1: 5 稀释, 混匀, 加入 ELISA 反应板, 100 $\mu$  L/孔, 每份样品各加 2 孔; 37℃ 反应 60 $\pm$ 5min。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P	P	S6	S6	S14	S14	S22	S22	S30	S30	S38	S38
B	WP	WP	S7	S7	S15	S15	S23	S23	S31	S31	S39	S39
C	N	N	S8	S8	S16	S16	S24	S24	S32	S32	S40	S40
D	S1	S1	S9	S9	S17	S17	S25	S25	S33	S33	S41	S41
E	S2	S2	S10	S10	S18	S18	S26	S26	S34	S34	S42	S42
F	S3	S3	S11	S11	S19	S19	S27	S27	S35	S35	S43	S43
G	S4	S4	S12	S12	S20	S20	S28	S28	S36	S36	S44	S44
H	S5	S5	S13	S13	S21	S21	S29	S29	S37	S37	S45	S45

注：S 代表检测样品；P 为阳性血清对照品；WP 为弱阳性血清对照品；N 为阴性血清对照品。

## 10.6 洗板

按 10.2 操作。

## 10.7 McAb-BTV VP7 和羊抗鼠 IgG-HRP 工作液配制

用稀释液将 McAb-BTV VP7 稀释 1000 倍，即为 McAb-BTV VP7 工作液；用稀释液将羊抗鼠 IgG-HRP 稀释 200 倍，即为羊抗鼠 IgG-HRP 工作液。

## 10.8 加 McAb-BTV VP7

向 ELISA 板中加入 McAb-VP7 工作液，100  $\mu$  L/孔，震荡混匀。37℃作用 30 min $\pm$ 2 min。

## 10.9 洗板

按 10.2 操作。

## 10.10 加酶结合物

向 ELISA 板中加入羊抗鼠 IgG-HRP 工作液，100 $\mu$  L/孔，轻轻混匀。酶标板置 37℃作用 30 min $\pm$ 2 min。

## 10.11 洗板

按 10.2 操作。

## 10.12 加底物液

向 ELISA 板中加入底物液，100  $\mu$  L/孔，室温避光反应 15 $\pm$ 2min。

## 10.13 终止反应

取出反应板，快速加入终止液，100  $\mu$  L/孔。

## 10.14 测吸光值

在加入终止液后 15 min 内，用酶标仪在 450nm 波长下，测定其光密度值，即 OD450 值。

## 11 结果判定

### 11.1 计算抑制百分率 (PI)

$$PI = (1 - \text{检测样品 OD450 平均值} / \text{标准阴性样品 OD450 平均值}) \times 100\%$$

### 11.2 判定标准

11.2.1 阴性血清对照样品 OD450 值  $\geq 1.0$ ，阳性血清对照样品  $PI \geq 75\%$ ，弱阳性血清对照样品  $50\% < PI < 70\%$ 时，实验成立。

11.2.2 若  $PI \geq 50\%$ ，则判定为阳性， $PI < 45\%$ ，则判定为阴性，若  $45\% \leq PI < 50\%$ ，判定为可疑。可疑样品需用重复检测，若再次检测仍为可疑，则判定为阳性。

## 附录 A

## (规范性附录)

## 溶液配方

- A.1 包被液 (0.05 mol/L、pH9.6 碳酸盐缓冲液)
- |  |  |
|--|--|
| 碳酸氢钠 (NaHCO <sub>3</sub> )             | 1.46 g   |
| 碳酸钠 (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ) | 0.79g (或 Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> · 10H <sub>2</sub> O 2.14g) |
| 蒸馏水                                    | 500 mL   |
- 溶解后, 调节 pH 值至 9.6, 置于 4℃ 冰箱保存, 一周内使用。
- A.2 ELISA 洗涤液 (0.01mol/L、pH7.4 PBS 0.05% Tween-20)
- |   |         |
|---|---------|
| 氯化钠 (NaCl)                                | 4.00 g  |
| 磷酸氢二钠 (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) | 0.57 g  |
| 磷酸二氢钾 (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )  | 0.10 g  |
| 氯化钾 (KCl)                                 | 0.10 g  |
| 吐温-20                                     | 0.25 mL |
| 加水至                                       | 500 mL  |
- 溶解后, 调节 pH 值至 7.4, 置于 4℃ 冰箱备用。
- A.3 稀释液 (含 3% 牛血清白蛋白的洗涤液)
- |              |        |
|--------------|--------|
| 洗涤液          | 100 mL |
| 牛血清白蛋白 (BSA) | 3 g    |
- 溶解后置于 4℃ 冰箱备用。
- A.4 封闭液 (含 1% 牛血清白蛋白的洗涤液)
- |              |        |
|--------------|--------|
| 洗涤液          | 100 mL |
| 牛血清白蛋白 (BSA) | 1 g    |
- 溶解后置于 4℃ 冰箱备用。
- A.5 底物液
- A.5.1 乙酸-柠檬酸缓冲液 (pH6.0)
- |           |        |
|-----------|--------|
| 乙酸钠 (A 液) |        |
| 乙酸钠       | 1.64 g |
| 水         | 200 mL |
- 溶解后置于 4℃ 冰箱备用。
- |           |        |
|-----------|--------|
| 柠檬酸 (B 液) |        |
| 柠檬酸       | 2.1 g  |
| 水         | 100 mL |
- 溶解后置于 4℃ 冰箱备用。
- 配制: 取 B 液约 2 mL 至 A 液中调 pH 值至 6.0, 置于 4℃ 冰箱备用。
- A.5.2 TMB 溶液
- |     |        |
|-----|--------|
| TMB | 350 mg |
| 甲醇  | 100 mL |
- 加温溶解后于室温闭光保存。
- A.5.3 底物液
- 临用前配制。
- |                       |        |
|-----------------------|--------|
| pH6.0 乙酸-柠檬酸缓冲液 (37℃) | 9.7 mL |
| TMB 溶液                | 300 μL |

双氧水 (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	7 μ L
A. 6 终止液: 1mol/L H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
浓硫酸	10 mL
水	170 mL

---