

SZDB/Z

深圳市标准化指导性技术文件

SZDB/Z 131-2015

非洲猪瘟病毒抗体检测 阻断酶联免疫吸 附法

Detection method of blocking enzyme-linked immunosorbent assay for
African swine fever

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 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 非洲猪瘟病毒 p54 抗原的制备.....	2
8 HRP 标记的单克隆抗体的制备.....	3
9 阻断 ELISA 试验.....	4
10 结果判定.....	6
附录 A.....	错误！未定义书签。
附录 B.....	错误！未定义书签。

前 言

本标准按照 GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

本标准的附录A为规范性附录，附录B为资料性附录。

本标准由深圳市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。

本标准主要起草人：曹琛福、花群义、吕建强、杨俊兴、宗卉、林庆燕、阮周曦、张彩虹、刘建利、孙洁、陶虹、廖立珊、唐金明、陈书琨、叶奕优、黄超华。

非洲猪瘟病毒抗体检测 阻断酶联免疫吸附法

1 范围

本标准规定了检测非洲猪瘟抗体的阻断酶联免疫吸附试验方法及其试剂制备方法。

本标准适用于非洲猪瘟抗体检测、流行病学调查和监测。

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 原理

酶联免疫吸附试验的酶标记抗体是由酶分子与抗体分子共价结合形成，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，从而判定有无相应的免疫反应。本标准阻断酶联免疫吸附试验则是在ELISA板上包被非洲猪瘟病毒p54重组蛋白特异性抗原，然后加入待检血清，如果待检血清中存在非洲猪瘟病毒p54蛋白抗体，就会与包被抗原发生反应，从而阻断下一步酶标抗非洲猪瘟病毒p54蛋白单克隆抗体与包被抗原结合。如果待检血清中抗体越多，则酶标单抗与包被抗原结合的就少，从而最终的显色反应就越浅，因此可通过酶标仪读数来判定待检血清样品中抗体的含量。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

ASF：非洲猪瘟。

ASFV：非洲猪瘟病毒。

bELISA：阻断酶联免疫吸附试验。

McAb：单克隆抗体。

IPTG：异丙基硫代-β-D-半乳糖苷。

SZDB/Z131-2015

PEG: 聚乙二醇。

SDS-PAGE: 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳。

PI: 阻断百分率。

HRP: 辣根过氧化物酶。

5 试剂和材料

a) 主要菌株与质粒:pET-52b(+) 3C/LIC-p54重组表达质粒(含ASFV p54目的基因,片段大小为552 bp);感受态细胞BL21(DE3);杂交瘤细胞株。

b) 主要试剂:LB培养基;PCR反应母液;琼脂糖凝胶;IPTG;氨苄青霉素;细菌细胞蛋白裂解液;液体石蜡;胎牛血清;IMDM基础培养液;ELISA包被液;封闭液;稀释液;显色液;终止液。具体配制方法见附录A。非洲猪瘟标准阴性血清、阳性血清。

c) 主要耗材:灭菌移液器吸头;灭菌1.5 mL离心管;培养皿;硝酸纤维素膜;ELISA板。

d) 实验动物:10周龄SPF级BALB/c雌鼠。

6 主要器械和设备

恒温摇床;

电泳仪;

台式高速离心机;

凝胶成像系统;

PCR扩增仪;

酶标仪;

洗板机;

超声波破碎仪;

微量移液器(10 μ L、100 μ L、1000 μ L量程各一支);

真空冻干机;

紫外分光光度计

7 非洲猪瘟病毒 p54 抗原的制备

7.1 质粒

为携带非洲猪瘟病毒 p54 基因的 pET-52b(+) 3C/LIC-p54 重组表达质粒,由深圳市检验检疫科学研究院构建、鉴定、保管和供应。

7.2 ASFV p54基因的检验

采用引物对（上游引物序列为5' -ATGGATTCTGAATTTTTTCA- 3'，下游引物序列为5' -GTTCAAGGAGTTTTCTAGGTC-3'）对pET-52b(+) 3C/LIC-p54重组表达质粒进行扩增，应扩增出552 bp的特异性条带，具体核苷酸序列可参考附录B。

7.3 ASFV p54 蛋白抗原的表达、纯化与检验

7.3.1 ASFV p54蛋白表达

将含pET-52b(+) 3C/LIC-p54重组表达质粒载体的BL21(DE3)宿主细胞，在含100 mg/L氨苄青霉素的LB平板上培养，挑取单个菌落，接种于2 mL含100 mg/L氨苄青霉素的LB培养液中，37 °C，200 r/min恒温摇床振荡培养至OD₆₀₀值为0.6左右。加入终浓度为2 mmol/L的IPTG，培养2 h后收取菌液。

7.3.2 ASFV p54蛋白抗原的纯化

7.3.2.1 将7.3.1中收集的菌液在4 °C 3000 r/min离心15 min，去上清，收集菌体。用PBS重悬沉淀，4 °C 3000 r/min离心15 min，去上清。用细菌细胞蛋白裂解液重悬菌体，冰上超声破碎，4 °C 12000 r/min离心15 min，收集上清液。

7.3.2.2 采用Ni柱亲和层析方法纯化7.3.2.1中收取的菌液超声破碎上清液，获得表达抗原，测定蛋白质浓度，加入抗原保护剂，分装每瓶0.5 mL，真空冻干保存。

7.3.3 ASFV p54蛋白抗原的检验及贮藏

7.3.3.1 性状 真空冻干保存的非洲猪瘟病毒p54重组蛋白呈白色固体，无臭、无味。

7.3.3.2 浓度测定 复溶后蛋白质浓度应不低于250 µg/mL。

7.3.3.3 纯度测定 采用SDS-PAGE对表达产物进行考马斯亮蓝染色，结果只在28 ku大小处出现条带。

7.3.3.4 特异性检验 将7.3.2.2中收取的蛋白抗原用SDS-PAGE电泳，经考马斯亮蓝染色，结果应在28 ku大小处出现诱导表达条带。采用非洲猪瘟标准阳性血清对表达产物进行免疫印迹分析，应只在28 Ku大小处出现特异性的杂交条带。

7.3.3.5 贮藏与有效期 置2~8 °C贮藏，有效期为12个月。

8 HRP 标记的单克隆抗体的制备

8.1 杂交瘤细胞

分泌抗非洲猪瘟病毒 p54 蛋白的特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株,由中国典型培养物保藏中心 (CCTCC) (武汉) 保藏 (细胞株保藏号: C2014212), 由深圳市检验检疫科学研究院动植检研究所构建、鉴定和供应。

8.2 单克隆抗体的制备和纯化

8.2.1 采用保存的杂交瘤细胞系, 制备 5×10^6 个/mL 的细胞悬液。取 10 周龄 BALB/c 雌鼠, 腹腔注射液体石蜡, 每只 0.5 mL, 1 周后向腹腔注射 1 mL 细胞悬液。7 d~10 d 后小鼠腹部明显胀大, 收集腹水。

8.2.2 将腹水于 4 °C 8000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 即为含抗非洲猪瘟病毒 p54 蛋白单克隆抗体的腹水。利用 Protein G 柱进行纯化, 纯化后用紫外分光光度计测定蛋白浓度, 用 20 mmol/L PBS (pH7.2) 将其稀释成 0.6 mg/mL, 加入 0.01% 硫柳汞。

8.3 单克隆抗体的HRP标记与检验

8.3.1 单克隆抗体的HRP标记

采用商业辣根过氧化物酶标记试剂盒对单克隆抗体进行酶标记, 分装冷冻保存。

8.3.2 HRP标记抗体的检验及贮藏

8.3.2.1 性状 冷冻保存的HRP标记抗体呈无色透明液体, 无臭、无味。

8.3.2.2 浓度测定 蛋白含量应不低于1.0 mg/mL。

8.3.2.3 效价测定 用7中制备的p54蛋白抗原 (2.5 µg/mL), 包被ELISA板进行间接ELISA试验, HRP标记抗体1: 1000稀释, OD值读数应大于1.0。

8.3.2.4 贮藏与有效期 -20 °C贮藏, 有效期12个月。

9 阻断 ELISA 试验

9.1 非洲猪瘟标准阳性血清

9.1.1 非洲猪瘟标准阳性血清来源

非洲猪瘟标准阳性血清可从世界动物卫生组织 (OIE) 参考实验室及中国农业部指定实验室等处购置。

9.1.2 非洲猪瘟阳性血清的检验及贮藏

9.1.2.1 性状 橙黄或淡黄色透明液体。

9.1.2.2 无菌检验 按现行《中国兽药典》第三部附录进行检验, 应无菌生长。

9.1.2.3 效价检验 用ASF国际参考ELISA试剂盒试验, PI值大于80%。

9.1.2.4 贮藏与有效期 2~8 °C贮藏, 有效期为12个月。

9.2 非洲猪瘟阴性对照血清

9.2.1 非洲猪瘟阴性对照血清来源

采自3月龄健康猪血清，经ASF国际参考ELISA试剂盒试验，检测为阴性的猪血清。

9.2.2 非洲猪瘟阴性血清的检验及贮藏

9.2.2.1 性状 橙黄或淡黄色透明液体。

9.2.2.2 无菌检验 按现行《中国兽药典》第三部附录进行检验，应无菌生长。

9.2.2.3 效价检验 国际参考试剂盒试验检测PI值小于40。

9.2.2.4 贮藏与有效期 2~8 °C贮藏，有效期为12个月。

9.3 待检血清样品的准备

采集血液，室温放置1~2 h，以3500 r/min离心10 min，分离得到血清。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。

9.4 阻断ELISA试验操作

9.4.1 包被

将6中所制备的p54抗原用包被液稀释至2.5 µg/mL，加入到ELISA板中，每孔100 µL，置4 °C冰箱过夜。

9.4.2 洗板

取出酶标板弃去液体，每孔加洗液300 µL，洗板，共三次。最后一次倒置拍干。

9.4.3 封闭

每孔加封闭液100 µL，37 °C反应1 h。

9.4.4 洗板

按9.4.2 操作。

9.4.5 加样

待检样品和标准阳性血清、阴性对照用稀释液作1: 5稀释，混匀，分别加入ELISA反应板，每份样品做两孔，每孔50 µL；37 °C反应1 h。

9.4.6 洗板

按9.4.2 操作。

9.4.7 配制 HRP 标记的 McAb 工作液

HRP 标记的 McAb：稀释成工作浓度（1：1000），混匀。

9.4.8 加 HRP 标记的 McAb

每孔加50 μL 的HRP标记的McAb工作液，震荡混匀。37 $^{\circ}\text{C}$ 作用30 min。

9.4.9 洗板

按9.4.2 操作。

9.4.10 加底物液

每孔加50 μL 底物液，37 $^{\circ}\text{C}$ 作用10 min。

9.4.11 加终止液

取出反应板，每孔快速加入50 μL 终止液，在15 min内测其吸光值（OD值）。

9.4.12 结果读取

用酶标仪在450 nm 波长下，测定其OD 值。

10 结果判定

10.1 计算公式

$$\text{PI} = (1 - \text{样品血清平均 OD 值} / \text{阴性血清对照平均 OD 值}) \times 100\%$$

10.2 判定标准

当标准阳性血清PI值 $\geq 80\%$ ，而标准阴性血清OD值 ≥ 1.0 时，试验成立。则待检样品可按下表判定，可疑样品需重复实验，结果仍为可疑则判为阳性。

阻断百分率（%）	结果
$\text{PI} \geq 45\%$	阳性
$40\% < \text{PI} < 45\%$	可疑
$\text{PI} \leq 40\%$	阴性

附录 A
(规范性附录)

溶液配方

A.1 LB 培养基

胰蛋白胨	10 g
酵母提取物	5 g
氯化钠	10 g

若配置固体培养基，则再加入 15g 琼脂。

A.2 PCR 反应母液

10×PCR 缓冲液	5 μL
dNTP 混合液	4 μL
Taq 酶	0.25 μL
上、下游引物	各 0.5 μL
模板	2 μL
灭菌蒸馏水	37.75 μL
	共 50 μL

A.3 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 (PBS, pH7.2)

磷酸二氢钠	0.2 g
磷酸氢二钠	2.9 g
氯化钾	0.2 g
调 pH 至	7.2
加蒸馏水至	1000 mL

115 kPa、20 min 高压灭菌，4 °C 保存备用。

A.4 包被液：0.05 mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液

NaHCO ₃	1.46 g
Na ₂ CO ₃	0.97 g (或Na ₂ CO ₃ ·10H ₂ O 1.2 g)
水	500 mL

溶解后置于 4 °C 冰箱，一周内使用。

A.5 洗涤液 (0.01 mol/L pH7.4 PBS 0.05%Tween-20, PBST)

SZDB/Z131-2015

NaCl	4 g
KH ₂ PO ₄	0.1 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	1.45 g
KCl	0.1 g
Tween-20	0.25 mL
水	500 mL

溶解后置于4 °C冰箱备用。

A. 6 稀释液：1%明胶或 5%鸡血清 PBST

洗涤液	100 mL
明胶	1 g
或洗涤液	95 mL
鸡血清	5 mL

溶解或混均后置于4 °C冰箱备用。

A. 7 底物液

A. 7.1 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°C冰箱备用。

柠檬酸（B液）：

柠檬酸	2.1 g
水	100 mL

溶解后置于4 °C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 °C冰箱备用。

A. 7.2 TMB 溶液

TMB	350 mg
甲醇	100 mL

加温溶解后于暗盒中存室温。

A. 7.3 工作底物液配制：临用前配制。

pH6.0乙酸—柠檬酸缓冲液 (37 °C)	9.7 mL
TMB溶液	300 μ L
H ₂ O ₂	7 μ L
A.8 终止液: 1 mol/L H₂SO₄	
浓硫酸	22.2 mL
水	177.8 mL
A.9 封闭液: 3%明胶或 10%灭能鸡血清 PBST。	

附录 B

(资料性附录)

非洲猪瘟病毒 p54 蛋白核苷酸参考序列 (GenBank: FJ174405.1)

```
1  atggattctg aatTTTTTca accggtttat ccgCGGCatt atggtgagtg tttgtcacca
61  gtcacccac caagcttctt ctccacacat atgtatacta ttctcattgc tategtggtc
121 ttagtcatta ttatcatcgt tctaactat ctattctctt caagaaagaa aaaagctgct
181 gccgctattg aggaggaaga tatacagttt ataaatcctt atcaagatca gcaatgggca
241 gaagtcactc cacaaccagg tacctctaaa ccggttgag cgactacagc aagtcaggc
301 aaaccagtca cggcagacc ggcaacaaac agaccagcaa caaacaacc agtcacggac
361 aaccagtta cggacagact agtcattgca actggcgggc cagcggccgc acctcggcc
421 gcgagtgtc atccgactga gccttacag acagtcacta ctcagaacac tgcttcacaa
481 acaatgtcgg ctattgaaaa ttacgacaa agaaacacct atacgataa agacctagaa
541 aactccttgt aa
```
