|  |  |
| --- | --- |
| ICS | 11.220 |
| CCS | |  | | --- | | D:\000000部门项目\09标准化插件开发\程序源代码\StandardEditor_ShanDongKeXieYuan\团标首页面字母T.pngD:\000000部门项目\09标准化插件开发\程序源代码\StandardEditor_ShanDongKeXieYuan\团标首页面字母T后面的反斜杠.png GXAS |   B 41 |

团体标准

T/GXAS XXXX—XXXX

禽偏肺病毒抗体间接N-ELISA检测方法

Indirect N-ELISA method for detection of of antibody against avian metapneumovirus

（本草案完成时间：2023年10月25日）

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

广西标准化协会  发布

1. 前言

本文件参照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这些专利的责任。

本文件由广西兽医协会提出归口并宣贯。

本文件起草单位：广西大学、广西参皇养殖集团有限公司、广西悦牧生物科技有限公司、广西祝氏农牧有限责任公司、南宁市良凤农牧有限责任公司、广西鸿光农牧有限公司、广西金陵农牧集团有限公司、广西富凤农牧集团有限公司、广西园丰牧业集团股份有限公司、广西贵港市港丰农牧有限公司。

本文件主要起草人：磨美兰、陈基明、唐金文、张桃妮、张愉、韦天超、黄腾、黄鉴妮、杨福剑、唐雪梅、陈莹、张宗尧、陈春婷、莫夏、张红云、潘杰、梁家绥、覃晨华、段玉婉、李和鸣、毛文荣、李毅、黄超、韦宗海、覃俊江、卢静、苏保华、黎剑能。

禽偏肺病毒抗体间接N-ELISA检测方法

* 1. 范围

本文件制定了禽偏肺病毒抗体间接N-ELISA检测方法的推荐性团体标准，包括规定了禽偏肺病毒抗体间接N-ELISA的试剂和材料、样品采集和处理、操作步骤、结果判定。

本文件主要用于禽偏肺病毒抗体的检测、禽偏肺病毒感染的诊断和流行病学调查。

* 1. 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

GB/T 16550-2020 新城疫诊断技术

* 1. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

* + 1. 禽偏肺病毒 Avian metapnenmovirus

禽偏肺病毒是一种主要感染鸡和火鸡，可引起上呼吸道感染、产蛋率和蛋品质下降的一种禽类的呼吸道病原体，属于副黏病毒科（Paramyxoviridae），肺病毒亚科（Pneumovirinae），偏肺病毒属（Pneumovirus）。

* + 1. 酶联免疫吸附试验 enzyme linked immunosorbent assay，ELSIA

以固相载体吸附技术和免疫酶技术相结合建立的一种检测方法。通常在合适的载体上，酶标记抗体或抗原与相应的抗原或抗体形成酶标记得抗原-抗体复合物。在一定的底物参与下，复合物上的酶会催化底物，使其水解、氧化或者还原成为另一种带色物质，酶降解底物和呈现色泽呈正比，因而可使用酶标仪进行测定，从而计算出参与反应的抗原或抗体的种类和含量。

* + 1. 吐温-20 tween-20

一种非离子型表面活性剂。

* + 1. 辣根过氧化物酶 horse radish peroxidase，HRP

常被用于免疫酶技术中的抗体或抗抗体的标记，而形成仍保持免疫学活性和酶活性的酶标记物，进而催化底物产生水解、氧化或还原反应，最终生成可溶或不可溶有色物质。

* + 1. 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 tetramethylbenzidine，TMB

用于酶联免疫吸附试验（ELISA）的可视化试剂，其可在辣根过氧化物酶（HRP）的催化下发生颜色变化。

吸光度 optical density，OD

表示被检测物吸收掉的光密度，是检测方法里的专有名词，检测单位用OD值表示。

* 1. 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

aMPV：禽偏肺病毒（Avian metapnenmovirus）

SPF：无特定病原体（Specific Pathogen Free）

* 1. 原理

本文件采用酶联免疫吸附法（ELISA），该方法利用抗原抗体反应具有特异性，将特异性的aMPV N蛋白吸附到固相载体的表面后，形成固相抗原。待测物中若含有相应的aMPV抗体，则可与包被的aMPV N蛋白相结合，并能继续和相应的辣根过氧化物酶标记的鸡IgG抗体结合形成符合物，加入酶反应的底物后，底物被酶催化成为有色底物，由于酶的催化效率很高，间接地放大了免疫反应的结果，使测定方法达到很高的敏感度。产物的量与待测物中的aMPV的抗体的量直接相关，因此可以根据颜色的深浅来进行定性或定量分析。

* 1. 试验条件

试验操作应在室温（18-25℃）下进行。

* 1. 试剂和材料

试验操作应在室温（18-25℃）下进行。

* + 1. 阳性血清

分离鉴定并经测序确定为aMPV，并用其免疫接种SPF鸡制备的标准阳性血清，经间接血凝试验验证结果为阳性。

* + 1. 阴性血清

SPF鸡制备的标准阴性血清，无母源抗体，经间接血凝试验结果为阴性。

* + 1. 酶结合物

HRP标记的抗鸡IgG抗体。

* + 1. 包被缓冲液

按照附录A中的A.1配置。

* + 1. 洗涤缓冲液（稀释缓冲液）

按照附录A中的A.2配置。

* + 1. 封闭液

按照附录A中的A.3配置。

* + 1. TMB显色液

商品化TMB显色液。

* + 1. 终止液

按照附录A中的A.4配置。

* + 1. LB液体培养基

氯化钠 1 g

酵母提取物 0.5 g

蛋白胨 1 g

将上述试剂按次序溶于100 mL去离子水中，充分溶解，高压消毒灭菌112 kPa 121℃ 30 min，于4℃冰箱保存备用。

* 1. 仪器设备

37℃恒温培养箱；酶标仪；天平：称量范围0 g-500 g，读数精确度0.01 g；低温离心机；冰箱；微量可调移液器（0.5 μL～2 μL、1 μL～10 μL、10 μL～100 μL、100 μL～1000 μL各1支；20 μL～300 μL 8道移液器1支）及配套一次性移液器吸头；1000 mL量筒；酶标板；灭菌1.5mL离心管；血清稀释用96孔板；一次性采血针。

* 1. 样品的采集和处理

应符合GB/T 16550-2020的要求。

* 1. 方法
     1. 包被抗原的制备

将NCBI收录的aMPV序列进行生物信息学分析，找到同源性高、保守、免疫原性好、大小为600 bp的N基因片段（N基因片段序列见附录B），进行密码子优化送至生物公司合成片段，并将N基因片段与表达载体pET-32a连接转化至表达菌BL21，将菌液以1:100的比例接种于新鲜的含100 μg/mL卡那霉素的LB液体培养基中，置于摇床振荡培养至OD600为0.6时，加入IPTG使其终浓度为0.6 mmol/L，继续培养6 h，离心收集菌体，将菌体沉淀悬浮于PBS中，经超声裂解菌体，12000 r/min，4℃，离心20 min后收集沉淀，利用包涵体蛋白纯化试剂盒进行纯化再透析复性，得到aMPV的N蛋白作为包被抗原。

得到的aMPV N蛋白通过BCA法测定蛋白浓度，同时按照Western blot实验步骤验证蛋白是否制备成功（aMPV N蛋白Western blot鉴定图见附录A 中的图A.1）。

* + 1. ELISA检测
       1. 包被抗原

将纯化的aMPV的N蛋白用包被缓冲液稀释至53.5 μg/mL，按100 μL/孔加到酶标板中，37 ℃孵育箱作用2 h后4 ℃包被过夜。

* + - 1. 洗涤

用洗涤缓冲液洗涤3次，每次5 min，吸取未结合的抗原及其他杂质。

* + - 1. 封闭

按300μL/孔向酶标板加入新鲜配置的封闭液后37℃孵育箱内封闭2h，甩干后同10.2.2洗涤3次。

* + - 1. 加待检血清

待检血清用稀释缓冲液按1:400稀释后按100μL/孔加入酶标板中，在37℃孵育箱孵育45min，同10.2.2中洗涤3次，注意设立阴阳性血清对照。

* + - 1. 加酶结合物

HRP标记的抗鸡IgG抗体用稀释缓冲液按1:4000稀释，按100 μL/孔加入酶标板中，于37℃孵育箱孵育45min，同10.2.2中洗涤3次。

* + - 1. 显色

按100μL/孔加入TMB底物避光显色。

* + - 1. 终止反应

按50μL/孔加入终止液终止反应。

* + - 1. 读OD值

利用ELISA酶标仪在450 nm波长下读取吸光度（OD值）。

* 1. 结果判定

在阳性血清的OD450值大于或等于0.386和阴性血清OD450值小于0.386的情况下，当待检样品的OD450值大于或等于0.386时，判定为阳性；当待检样品的OD450值小于0.386时，判定为阴性。

* 1. 生物安全措施

生物安全措施按照GB 19489的规定执行。

* 1. 废弃物处理和防止污染的措施

试验过程中注意做好个人的安全防护工作，废弃物应做好无害化处理。

1. （资料性）

ELISA检测相关溶液配置及包被蛋白鉴定图

* 1. 包被缓冲液的配置

碳酸钠（Na2CO3 ） 1.59 g

碳酸氢钠（NaHCO3 ） 2.93 g

将上述试剂按次序溶于900 mL去离子水中，充分溶解，加去离子水将溶液定容至1 L，一般4℃保存。

* 1. 洗涤缓冲液（稀释缓冲液）配置

氯化钠（NaCl） 8.0 g

磷酸氢二钠（Na2HPO4•12H2O） 2.88 g

磷酸二氢钾（KH2PO4） 0.2 g

氯化钾（KCl） 0.2 g

将上述试剂按次序溶于900 mL去离子水中，充分溶解，加去离子水将溶液定容至1L，高压消毒灭菌112kPa 121℃ 30min，再加入0.5mL Tween 20，于室温保存。

* 1. 封闭液配置

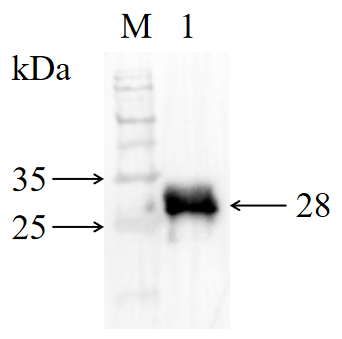
将5g脱脂奶粉溶于100 mL A.2稀释缓冲液中。

* 1. 终止液的配置

将22.2 mL浓硫酸缓慢加入至177.8 mL蒸馏水中，期间不断搅拌。

* 1. aMPV N蛋白Western blot鉴定图

见图A.1。



M.蛋白质分子质量标准; 1.N蛋白

图A.1 N蛋白的Western-blot鉴定

1. （规范性）  
   N基因片段序列

优化密码子后的N基因片段序列如下：

GGATCCCTGAAACGTTTTCCGCGCATTGATATTCCGAAAATTGCCCGCAGCTTTTATGATCTGTTTGAACAGAAAGTTTACTACCGTAGCCTGTTTATTGAATATGGTAAAGCCCTGGGTAGTAGTAGTACCGGTAGTAAAGCCGAAAGTCTGTTTGTGAATATTTTTATGCAGGCATATGGCGCCGGTCAGACCATGCTGCGTTGGGGTGTTATTGCCCGTAGTAGTAATAATATTATGCTGGGCCATGTGAGTGTTCAGGCAGAACTGAAACAGGTTACCGAAGTTTATGATCTGGTGCGTGAAATGGGCCCGGAAAGCGGTCTGCTGCATCTGCGTCAGAGTCCGAAAGCCGGTCTGCTGAGTCTGGCCAATTGCCCGAATTTTGCCAGCGTTGTGCTGGGCAATGCAAGCGGTCTGGGTATTCTGGGTATGTATCGTGGTCGTGTGCCGAATACCGAACTGTTTGCAGCCGCCGAAAGTTATGCCCGCAGCCTGAAAGAAAGCAATAAAATTAATTTCAGCAGCCTGGGCCTGACCGAAGAAGAAAAAGAAGCCGCAGAAAATTTTCTGAATATTAATGAAGAGGGCCAGAATGATTATGAACTCGAG

