

T/GXAS

团 体 标 准

T/GXAS 722—2024

禽偏肺病毒抗体间接 N-ELISA 检测方法

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

2024 - 05 - 24 发布

2024 - 05 - 30 实施

广西标准化协会 发布

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、董轩铭、赵文青、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、林铁昌、李非、李羽娜、韦宗海、覃俊江、卢静、黄超、李毅、苏保华、黎剑能、毛文荣、韦湘、滕祥。

禽偏肺病毒抗体间接 N-ELISA 检测方法

1 范围

本文件界定了禽偏肺病毒抗体检测涉及的术语和定义,描述了禽偏肺病毒抗体间接 N-ELISA 检测方法。

本文件适用于禽偏肺病毒抗体的检测。

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。

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

禽偏肺病毒 Avian Metapneumovirus, aMPV

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

3.2

重组 N 蛋白酶联免疫吸附试验 N-enzyme linked immunosorbent assay, N-ELISA

以重组 aMPV N 蛋白包被在固相载体表面,然后加入待测抗体和酶标抗体,反应后用洗涤的方法使结合在固相上的抗原抗体复合物与未结合的物质分离,最后加入底物,根据酶对底物催化的显色反应程度而对待测抗体进行定性或定量的分析方法。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

SPF: 无特定病原体 (Specific Pathogen Free)

5 试验条件

试验操作应在室温 (18 °C ~ 25 °C) 下进行,所使用配置试剂均为分析纯级别。

6 试剂和材料

6.1 N 抗原

按照附录 A 配置。

6.2 阴阳性血清

分离鉴定并经测序确定为 aMPV,并用其免疫接种 SPF 鸡制备得到的阳性血清;SPF 鸡制备的阴性血清,无 aMPV 抗体。

6.3 酶结合物和 TMB 显色液

宜使用商品化的 HRP 标记的抗鸡 IgG 抗体和 TMB 显色液。

6.4 所需配制试剂

包被缓冲液、洗涤缓冲液（稀释缓冲液）、封闭液和终止液按照附录 B 配置。

7 仪器设备

7.1 37 °C 恒温培养箱。

7.2 酶标仪。

8 样品采集和处理

应符合NY/T 541的要求。

9 检测步骤

9.1 抗原包被

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 °C 恒温培养箱作用 2 h 后 4 °C 包被过夜。

9.2 洗涤

用洗涤缓冲液洗涤 3 次，每次 5 min。

9.3 封闭

按 300 μL/孔向酶标板加入新鲜配置的封闭液后 37 °C 恒温培养箱内封闭 2 h，甩干后按 9.2 操作。

9.4 加待检血清

待检血清用稀释缓冲液按 1:400 稀释后按 100 μL/孔加入酶标板中，在 37 °C 恒温培养箱孵育 45 min，按 9.2 中洗涤 3 次，注意设立阴阳性血清对照。

9.5 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 °C 恒温培养箱孵育 45 min，按 9.2 操作。

9.6 显色

按 100 μL/孔加入 TMB 底物避光显色，作用 20 min。

9.7 终止反应

按 50 μL/孔加入终止液终止反应，作用 5 min。

9.8 读数

利用酶标仪在 450 nm 波长下读取吸光度（OD 值）。

9.9 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。

附录 A

(资料性)

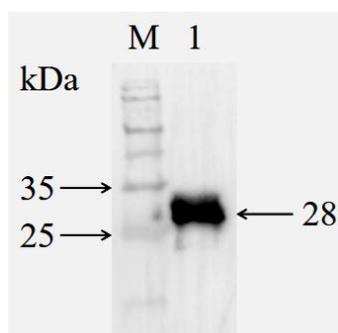
N 基因的获得及包被抗原蛋白的制备与鉴定

N 基因序列如下：

```
GGATCCCTGAAACGTTTTCCGCGCATTGATATTCCGAAAATTGCCCGCAGCTTTTATGATCTGTTTGAACAGAAAGTTTACTACC
GTAGCCTGTTTATTGAATATGGTAAAGCCCTGGGTAGTAGTAGTACCGGTAGTAAAGCCGAAAGTCTGTTTGTGAATATTTTATGCAG
GCATATGGCGCCGGTCAGACCATGCTGCGTTGGGGTGTATTGCCCGTAGTAGTAATAATATTATGCTGGGCCATGTGAGTGTTTCAGGC
AGAACTGAAACAGGTTACCGAAGTTTATGATCTGGTGCCTGAAATGGGCCCGAAAGCGGTCTGCTGCATCTGCGTCAGAGTCCGAAAG
CCGGTCTGCTGAGTCTGGCCAATTGCCCGAATTTTGCCAGCGTTGTGCTGGGCAATGCAAGCGGTCTGGGTATTCTGGGTATGTATCGT
GGTCGTGTGCCGAATACCGAACTGTTTGCAGCCGCCGAAAGTTATGCCCGCAGCCTGAAAGAAAGCAATAAAAATTAATTTTCAGCAGCCT
GGGCCTGACCGAAGAAGAAAAAGAGCCGCGAGAAAATTTCTGAATATTAATGAAGAGGGCCAGAATGATTATGAACTCGAG
```

按照以上序列合成到表达载体 pET-32a 中，转化到表达菌 BL21 中表达蛋白，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 °C，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。

aMPV N 蛋白通过 BCA 法测定蛋白浓度，并进行 Western blot 鉴定，结果见图 A. 1。



^a 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

附录 B
(资料性)
ELISA 检测相关溶液配置

B.1 包被缓冲液的配置

包被缓冲液的配置如下:

碳酸钠 (Na_2CO_3)	1.59 g
碳酸氢钠 (NaHCO_3)	2.93 g

将上述试剂按顺序溶于 900 mL 去离子水中, 充分溶解, 加去离子水将溶液定容至 1 L, 4 °C 保存。

B.2 洗涤缓冲液 (稀释缓冲液) 配置

洗涤缓冲液的配置如下:

氯化钠 (NaCl)	8.0 g
磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2.88 g
磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)	0.2 g
氯化钾 (KCl)	0.2 g

将上述试剂按顺序溶于 900 mL 去离子水中, 充分溶解, 加去离子水将溶液定容至 1 L, 121 °C 高压蒸汽灭菌 30 min, 再加入 0.5 mL Tween 20, 于室温保存。

B.3 封闭液配置

将 5 g 脱脂奶粉溶于 100 mL 稀释缓冲液中。

B.4 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。

中华人民共和国团体标准
禽偏肺病毒抗体间接N-ELISA检测方法
T/GXAS 722—2024
广西标准化协会统一印制
版权专有 侵权必究