

团 体 标 准

T/CVMA 169—2024

禽腺病毒 4 型间接 ELISA 抗体检测方法

Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies
against fowl adenovirus serotype 4

2024-7-4 发布

2024-7-4 实施

中国兽医协会 发布

中国兽医协会
CVMA
全国动物卫生大会

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。

本文件由中国兽医协会提出并归口。

本文件起草单位：中国农业大学、北京亿森宝生物科技有限公司、成都海关技术中心、重庆市动物疫病预防控制中心、四川省动物疫病预防控制中心、北京市动物疫病预防控制中心。

本文件主要起草人：张国中、王新杰、林华、杨慧明、赵静、孙晓明、白雪冬、安徽、董春霞、欧阳吴莉、蒋佳利、孙燕、裴超信、陈斌、王慧强、梅力。

中国兽医协会
CVMA
全国动物卫生大会

禽腺病毒 4 型间接 ELISA 抗体检测方法

1 范围

本文件描述了禽腺病毒 4 型间接 ELISA 抗体检测方法。

本文件适用于间接 ELISA 方法检测鸡血清中的禽腺病毒 4 型抗体，用于禽腺病毒 4 型感染的流行病学调查和分析。

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

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

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

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

本文件采用间接酶联免疫吸附试验（ELISA）方法。该方法利用抗原抗体反应具有特异性，在酶标板上包被禽腺病毒4型重组Fiber-2蛋白抗原后，如果待检血清中存在禽腺病毒4型抗体，就会与包被的Fiber-2蛋白发生反应，并继续和相应的辣根过氧化物酶标记的兔抗鸡IgY抗体结合形成复合物。加入酶反应的底物后，底物被酶催化成为有色产物。显色深浅与样品中的特异性抗体含量成正相关，故可根据呈色的深浅进行定性或定量分析。通过酶标仪读数的方式判定待检鸡血清中是否有禽腺病毒4型抗体。

5 试剂

5.1 本实验所用试剂均为分析纯，实验室用水应符合 GB/T 6682 的规定。

5.2 禽腺病毒 4 型重组 Fiber-2 蛋白抗原，按附录 A 的方法制备。

5.3 阴性对照，按照附录 B 中 B.1 的方法制备。

5.4 阳性对照，按照 B.2 的方法制备。

5.5 酶标记物：商品化的辣根过氧化物酶标记的兔抗鸡 IgY。

5.6 包被缓冲液，按照附录 C 中 C.1 的方法配制。

- 5.7 封闭液，按照 C.2 的方法配制。
- 5.8 酶稀释液，按照 C.3 的方法配制。
- 5.9 样品稀释液，按照 C.4 的方法配制。
- 5.10 25 倍浓缩洗涤液，按照 C.5 的方法配制。
- 5.11 显色液 A，按照 C.6 的方法配制。
- 5.12 显色液 B，按照 C.7 的方法配制。
- 5.13 终止液，按照 C.8 的方法配制。

6 设备及耗材

- 6.1 酶标仪。
- 6.2 台式低温高速离心机（最高转速 13300 r/min）。
- 6.3 洗板机。
- 6.4 37 °C 恒温培养箱。
- 6.5 2 °C~8 °C 冰箱、-20 °C 冰箱。
- 6.6 单道微量移液器（0.5 μL~10 μL；10 μL~200 μL；100 μL~1 000 μL）。
- 6.7 多道移液器（300 μL）。
- 6.8 酶标板。
- 6.9 血清稀释板：96 孔一次性 U 型血凝板或 96 孔细胞培养板。
- 6.10 一次性注射器（5 mL~10 mL）。

7 样品采集、运输与保存

7.1 样品采集与处理

采集静脉血时，每只鸡使用一个注射器。宜进行静脉采血，不少于 2 mL。室温静置于斜面，待血液自然凝固后，置 2 °C~8 °C 冰箱中放置不少于 2 h，4000 r/min 离心 10 min。用移液器小心吸出上层血清。样品采集应符合 GB 19489 和 NY/T 541 的规定。

7.2 血清样品的存放与运送

血清样品若在一周内检测，可置 2 °C~8 °C 条件下保存；若超过一周检测，应置于 -20 °C 以下冷冻保存。样品的保存与运输应符合 NY/T 541 的规定，样品的生物安全标识符合《兽医实验室生物安全技术管理规范》要求。

8 间接 ELISA 试验步骤

8.1 包被

使用包被缓冲液将禽腺病毒4型重组Fiber-2蛋白稀释至1.5 μg/mL。每孔加入100 μL稀释后的禽腺病毒4型重组Fiber-2蛋白包被酶标板，置于2 °C~8 °C包被16 h。包被结束后，弃去包被缓冲液，每孔加入300 μL洗涤液，重复洗板5次，每次洗涤后应弃去孔内的液体。最后一次洗涤后在吸水纸上拍干。

8.2 封闭

每孔加入300 μL封闭液，置于37 °C封闭4 h。封闭结束后，弃去封闭液，每孔加入300 μL洗涤液，重复洗板2次，每次洗涤后应弃去孔内的液体。最后一次洗涤后在吸水纸上拍干。

8.3 干燥

将包被板置于25 °C干燥2 h。装入铝箔袋，放入干燥剂，抽真空，置于2 °C~8 °C保存备用。

8.4 样品稀释准备

用样品稀释液将待检样品按1:41进行稀释（例如：5 μL样品加200 μL样品稀释液）。

8.5 加样

取出包被板，检测孔中加入100 μL稀释好的样品。阴性对照、阳性对照不稀释，各加2孔，每孔100 μL。置37 °C恒温培养箱中温育15 min。弃去孔内液体，每孔加入300 μL洗涤液，重复洗板5次，每次洗涤后应弃去孔内的液体。最后一次洗涤后在吸水纸上拍干。

8.6 加酶标记物

用酶稀释液将辣根过氧化物酶标记的兔抗鸡IgY按1:20000进行稀释，每孔加入100 μL稀释后的酶标记物。置37 °C恒温培养箱中温育15 min。弃去孔内液体，每孔加入300 μL洗涤液，重复洗板5次，每次洗涤后应弃去孔内的液体。最后一次洗涤后在吸水纸上拍干。

8.7 显色

每孔分别加入50 μL显色液A和50 μL显色液B。37 °C恒温培养箱中温育15 min。

8.8 终止

每孔加入终止液50 μL，终止反应。

8.9 测值

酶标仪测量并且记录样品和对照在450_{nm}处的吸光值（OD_{450nm}值），15 min内测值有效。

9 结果判定

9.1 成立标准

按式（1）和式（2）计算阴性对照OD_{450nm}值平均值和阳性对照OD_{450nm}值平均值：

$$NC = (NC_1 + NC_2) / 2 \dots\dots\dots (1)$$

式中：

NC —— 阴性对照OD_{450nm}值平均值；

NC₁、NC₂ —— 阴性对照孔1、孔2的OD_{450nm}值；

$$PC = (PC_1 + PC_2) / 2 \dots\dots\dots (2)$$

式中：

PC ——阳性对照OD_{450nm}值平均值；

PC₁、PC₂——阳性对照孔1、孔2的OD_{450nm}值。

试验成立判断标准：(PC-NC) ≥0.5, 并且NC ≤ 0.1

9.2 判定标准

9.2.1 临界值的计算：临界值=阴性对照平均值+0.05（若阴性对照的OD_{450nm}值小于0.05，按0.05计算）。

9.2.2 结果判定：样本OD_{450nm}值≥临界值，判为禽腺病毒4型抗体阳性；样本OD_{450nm}值<临界值，判为禽腺病毒4型抗体阴性。

附录 A (规范性)

禽腺病毒 4 型 Fiber-2 蛋白的制备方法

A.1 禽腺病毒 4 型 Fiber-2 氨基酸参考序列

ATGCTCCGGGCCCTAAAAGAAGACATTCGAAAACGGGAAGCCCGAGACCGAAGCGGGAC
CTTCCCCGGCTCCAATCAAGCGCGCCAAACGCATGGTGAGAGCATCCCAGCTTGACCTGGTTTAT
CCTTTCGATTACGTGGCCGACCCCGTCCGAGGGGCTCAACCCGCCTTTTTTGGGAGGCTCAGGACC
CCTAGTGGACCAGGGCGGACAGCTTACGCTCAACGTCACCGATCCCATCATCATCAAGAACAGA
TCGGTGGACTTGGCCACGACCCAGTCTCGATGTCAACGCCAAGGTCAACTGGCGGTGGCCGT
TGACCCCGAAGGGGCCCTGGACATCACCCCGATGGACTGGACGTCAAGGTGACGGAGTGACC
GTAATGGTCAACGATGACTGGGAAGTGGCCGTAAGTTCGACCCCGTCCGGCGGATTGGATTCCA
CCGCGGGTGGACTGGGGGTCAGCGTGGACGACACCTTGCTCGTGGATCAGGGAGAAGTGGGCGT
ACACCTCAACCAACAAGGACCCATCACTGCCGATAGCAGTGGTATCGACCTCGAGATCAATCCTA
ACATGTTACGGTCAACACCTCGACCGGAAGCGGAGTGGTGGAACTCAACCTAAAAGCGCAGGG
AGGCATCCAAGCCGACAGTTCGGGAGTGGGCGTTTCCGTGGATGAAAGCCTACAGATTGTCAAC
AACACTCTGGAAGTGAAACCGGATCCCAGCGGACCGCTTACGGTCTCCGCCAATGGCCTAGGGC
TGAAGTACGACACTAATACCCTAGCGGTGACCGCGGGCGCTTAACCGTGGTCCGAGGGGGGAG
CGTCTCCACACCCATCGCTACTTTTGTCTCGGGAAGTCCCAGCCTCAACACCTACAATGCCACGA
CCGTCAATTCCAGCGGAACGCCTTCTCTTGCCTACTACCTTCAACAGTGGAAACATACAGGGG
CTCCTTGTTACCTCCCTCTACTTGAAATTGGACAGCGCCACCATGGGGAATCGCCCTGGGGACCT
CAACTCCGCCAATGCCAAATGGTTCACCTTTTGGGTGTCCGCCTATCTCCAGCAATGCAACCCCTC
CGGATTCAAGCGGGAACGGTCAGCCCCTCCACCGCCACCTCACGGACTTTGAACCCATGGCCA
ATAGGAGCGTGACCAGCCATGGACGTAAGTCCGGCCAATGGATACTATGAACCATCCATCGGGGA
ATTCCAAGTGTTCAGCCCGGTGGTAACAGGTGCCTGGAACCCGGGAAACATAGGGATCCGCGTC
CTCCCGTGCCGGTTTTCCGGCCTCCGGAGAGCGATAACCCCTTCTATGCTATAGTCTGCAGTGCAC
GAACGCGAGCATTTTTAATCCAAACAACAGCGGAACCATGATCGTGGGACCCGTGCTCTACAGCT
GTCCAGCGGCCTCCCTCCCGTAA

A.2 引物序列

上游引物: 5' -CCGGATATCATGCTCCGGGCCCTAAAAGAAG-3'

下游引物: 5' -CCGAAGCTTTTACGGGAGGGAGGCCGCTGG-3'

A.3 方法

A.3.1 重组载体的构建

提取禽腺病毒4型HB1501株的DNA,用A.2引物扩增Fiber-2基因,琼脂糖凝胶电泳并纯化回收相应的扩增片段,片段大小为1440bp。纯化后的基因片段和pET-32a原核表达载体分别用*EcoR* V和*Hind* III限制性内切酶酶切,经连接酶连接并转化于Trans 109感受态细胞中,筛选获得重组阳性质粒pET32a-Fiber-2。将构建成功的原核表达质粒pET32a-Fiber-2转化到大肠杆菌BL21(DE3),获得阳性菌株BL21(DE3)-Fiber-2。

A.3.2 目的蛋白的表达与纯化

将BL21 (DE3) -Fiber 2种子液按照培养基体积1%量接种于LB培养液（含100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素）中，置于37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床200 r/min振荡培养，当 $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ 值达到0.4~0.6时，加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷（IPTG）至终浓度为0.6 mmol/mL后，置于30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床200 r/min振荡培养5 h。收集菌液，8000 r/min室温离心5 min，弃去管中液体，用PBS重悬菌体，离心洗涤2次，弃上清，加入原菌液体积10%的PBS重悬，至于冰上，在功率200 W的条件下超声波裂解细菌，超声裂解3 s，停顿6 s，直至菌液变清亮。将上述在裂解物4 $^{\circ}\text{C}$ 下12000 r/min离心20 min，收集沉淀，用与上清液同等体积的PBS重悬，然后使用His-tag包涵体蛋白纯化试剂盒纯化目的蛋白。纯化后的Fiber-2蛋白放入即用型透析袋中，浸于含有6 mol/L尿素的PBS溶液中，4 $^{\circ}\text{C}$ 透析12 h。更换溶液为含4 mol/L尿素的PBS溶液，4 $^{\circ}\text{C}$ 透析12 h。再更换溶液为含2 mol/L尿素的PBS溶液，4 $^{\circ}\text{C}$ 透析12 h。透析后的Fiber-2蛋白用0.22 μm 滤器过滤，经商品化BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度后分装，置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

附 录 B

(规范性)

阴性对照和阳性对照的制备

B.1 阴性对照的制备

B.1.1 阴性对照血清制备

4周龄以上SPF鸡，心脏采血，分离血清。血清用0.22 μm滤器过滤除菌，无菌定量分装，1 mL/瓶，置-20 °C以下保存，标记为“禽腺病毒4型阴性对照血清”，同时注明制备日期等信息。

B.1.2 阴性对照制备

将禽腺病毒4型阴性对照血清用样品稀释液按1:41进行稀释，即为阴性对照。

B.2 阳性对照的制备

B.2.1 阳性对照血清制备

禽腺病毒4型HB1501株在LMH细胞上增殖至病毒滴度为 $10^{7.0}$ TCID₅₀/0.2mL，经0.1%甲醛灭活，弗氏佐剂乳化后作为免疫原经颈部皮下免疫21日龄SPF鸡20只，0.5 mL/只。免疫28 d后以相同剂量进行二次免疫。二次免疫后21 d，对免疫鸡心脏采血，分离血清。取中和效价(1:320)~(1:640)的血清均匀混合。灭活处理后用0.22 μm滤器过滤除菌，无菌定量分装，1 mL/瓶，置-20 °C以下保存，标记为“禽腺病毒4型阳性对照血清”，同时注明制备日期等信息。

B.2.2 阳性对照制备

禽腺病毒4型阳性对照血清用样品稀释液按1:41进行稀释，即为阳性对照。

附录 C
(规范性)
相关试剂的配制

C.1 包被缓冲液

称取碳酸钠 1.59 g、碳酸氢钠 2.93 g，加入 800 mL 灭菌纯化水搅拌溶解，加灭菌纯化水定容至 1000 mL，调 pH 值 9.6~9.8，2 °C~8 °C 保存。

C.2 封闭液

称取十二水合磷酸氢二钠 2.9 g、磷酸二氢钾 0.2 g、氯化钠 8.0 g、氯化钾 0.2 g，加入 800 mL 灭菌纯化水搅拌溶解，再加入牛血清白蛋白 5.0 g，再加入 0.5 mL ProClin 300，0.5 mL 吐温-20，灭菌纯化水定容至 1000 mL，调 pH 值 7.2~7.4，2 °C~8 °C 保存。

C.3 酶稀释液

称取十二水合磷酸氢二钠 2.9 g、磷酸二氢钾 0.2 g、氯化钠 8.0 g、氯化钾 0.2 g，加入 800 mL 灭菌纯化水搅拌溶解，再加入牛血清白蛋白 20.0 g，再加入 1 mL ProClin 300，1 mL TrionX 100，灭菌纯化水定容至 1000 mL，调 pH 值 7.2~7.4，过滤除菌，2 °C~8 °C 保存。

C.4 样品稀释液

称取十二水合磷酸氢二钠 2.9 g、磷酸二氢钾 0.2 g、氯化钠 8.0 g、氯化钾 0.2 g，加入 800 mL 灭菌纯化水搅拌溶解，再加入牛血清白蛋白 20.0 g，再加入 1 mL ProClin 300，1 mL 吐温-20，灭菌纯化水定容至 1000 mL，调 pH 值 7.2~7.4，过滤除菌，2 °C~8 °C 保存。

C.5 25 倍浓缩洗涤液

称取十二水合磷酸氢二钠 72.5 g、磷酸二氢钾 5.0 g、氯化钠 200.0g、氯化钾 5.0 g，加入 800 mL 灭菌纯化水搅拌溶解，再加入 1 mL ProClin 300、25 mL 吐温-20，加灭菌纯化水定容至 1000 mL，过滤除菌，2 °C~8 °C 保存。使用前用灭菌纯化水将 25 倍浓缩洗涤液按 1:25 进行稀释，即 1 份 25 倍浓缩洗涤液加 24 份灭菌纯化水。例如：40 mL 的 25 倍浓缩洗涤液加入 960 mL 灭菌纯化水。

C.6 显色液A

称取柠檬酸 5.76 g、过氧化脲 0.5 g、乙酸钠 6.21 g，加入 800 mL 灭菌纯化水搅拌溶解，再加入 0.5 mL ProClin 300，而后加灭菌纯化水定容至 1000 mL，过滤除菌，2 °C~8 °C 保存。

C.7 显色液B

称取柠檬酸 5.76 g、四甲基联苯胺 0.2 g，加入甲醇 100 mL 溶解，再加入 0.5 mL ProClin 300，最后加灭菌纯化水定容至 1000 mL，过滤除菌，2 °C~8 °C 避光保存。

C.8 终止液

量取灭菌纯化水 800 mL，缓慢加入浓硫酸（18.4 mol/L）111 mL，搅拌均匀，而后加灭菌纯化水定容至 1000 mL，2 °C~8 °C 保存。

参考文献

- [1] 兽医实验室生物安全技术管理规范（中华人民共和国农业部公告第 302 号）
-

中国兽医协会
CVMA