



中国畜牧兽医学动物福利与健康养殖分会技术标准

T/CAAV-AWHB 2002—2021

羊腐败梭菌间接 ELISA 检测方法

Indirect ELISA method for *Clostridium putrificum* in sheep



2021-02-11 发布

2021-03-01 实施

中国畜牧兽医学动物福利与健康养殖分会 发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第一部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。本规程由中国畜牧兽医学会动物福利与健康养殖分会提出并归口。

本文件规程由中国畜牧兽医学会动物福利与健康养殖分会发布，版权归中国畜牧兽医学会动物福利与健康养殖分会所有，任何组织及个人未经规程所有单位许可，不得以任何形式全部或部分使用。

本规程的附录A为规范性附录。

本规程起草单位：山东农业大学、江苏省农业科学院兽医研究所、山东绿都生物科技有限公司、金宇保灵生物药品有限公司、重庆澳龙生物制品有限公司、吉林正业生物制品股份有限公司、青海生物药品厂有限公司、山东戴尔塔生物工程有限公司。

本规程主要起草人：柴同杰、韦良孟、沈志强、王芳、伏刚、冉智光、韩四娥、宋松林、廉维、贾青燕、李宁、徐为中、戴培强、张兆鹏。



羊腐败梭菌间接 ELISA 检测方法

1 范围

本文件规定了羊腐败梭菌间接ELISA检测方法的样品采集，腐败梭菌分离培养与鉴定、检测操作规程以及结果判定等内容。

本文件适用于血清中腐败梭菌病抗体的定性和定量检测，可以对腐败梭菌病（例如羊快疫）进行快速、有效的检测，还适用于腐败梭菌病治疗药物和疫苗的开发。

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

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

农业农村部《高致病性动物病原微生物菌(毒)种或者样本运输包装规范》

CN 110244042 A 羊腐败梭菌的间接ELISA检测试剂盒

3 术语、定义和缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1 ELISA Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

免疫酶联吸附试验。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

3.2.1 PCR: 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction)

3.2.2 OD: 光密度 (Optical density)

3.2.3 HRP: 辣根过氧化物酶 (horse radish peroxidase)

4 仪器和设备

4.1 冰箱 (4 °C, -20 °C)

4.2 电子天平

4.3 倒置显微镜

4.4 PCR 仪

4.5 紫外凝胶成像分析系统

- 4.6 台式冷冻离心机（最大离心力为 15, 000 g）
- 4.7 厌氧培养箱
- 4.8 酶标仪（检测波长 400nm~750nm）
- 4.9 紫外-可见分光光度计（检测波长 190nm~1100nm）
- 4.10 单道微量移液器（0.5 μ L~10 μ L, 10 μ L~100 μ L, 20 μ L~200 μ L, 100 μ L~1000 μ L）
- 4.11 无菌离心管（1.5 mL）
- 4.12 一次性注射器（5 mL）
- 4.13 透明 96 孔板

5 试剂与耗材

本发明所用试验材料均为本领域常规的试验材料，除另有规定外，所有试剂均为分析纯，实验用水应符合GB/T 6682 中相关规定。DNA的提取采用细菌DNA抽提试剂盒提取。腐败梭菌阳性血清及阴性血清为山东农业大学环境微生物实验室提供。抗原包被液、封闭液、洗涤液、样品稀释液、酶标二抗、底物显色液和终止液的配制见附录A。

6 操作步骤

6.1 样品采集、保存和运输

血液样品的采集按照NY/T 541进行。每个动物单独使用一个注射器，无菌采集血液3~5 mL。血液样品分离出血清后短期可置于4 $^{\circ}$ C保存；短时间内无法及时检测的，应置于-20 $^{\circ}$ C保存，避免反复冻融。

样品运输时使用保温箱和冰袋，后密封运输。包装和运输应符合农业农村部《高致病性动物病原微生物(毒)种或者样本运输包装规范》和交通运输部关于危险品运输管理的有关规定。

6.2 样品处理

血清样品的处理按照NY/T 541进行。将血液样品在室温下倾斜30 $^{\circ}$ 放置2 h~4 h，待血液凝固有血清析出时，无菌剥离血凝块，待大部分血清析出后可取出血清，必要时可低速离心（1, 000 g离心10 min~15 min）分离出血清。待检样品需先在56 $^{\circ}$ C条件下灭活30 min。取200 μ L~400 μ L上层血清于无菌离心管中，编号备用。

6.3 腐败梭菌培养物的制备及鉴定

6.3.1 腐败梭菌培养基的制备

培养基由以下重量份的原料制成：厌氧肉干汤35份~36份、葡萄糖2份~4份、L-半胱氨酸盐酸盐0.2份~0.4份、胰蛋白胨6份~8份和水1000份。

6.3.2 腐败梭菌的培养和鉴定

将腐败梭菌参考株（购自美国菌种保藏中心，保藏号： ATCC 12464）冻干粉无菌操作接种于培养基中，在37 $^{\circ}$ C厌氧环境中静置增菌培养12 h~24 h，设置对照组为未接种细菌的增菌液，紫外分光光度计检测细菌培养物OD_{600 nm}数值，当达到增菌产毒高峰时停止培养。

将细菌培养物进行革兰氏染色镜检，镜检可见典型的腐败梭菌培养形态，通过细菌DNA抽提试剂盒提取厌氧培养24 h后的细菌培养液，运用腐败梭菌 α 毒素csa基因鉴定引物，鉴定增殖后的细菌培养物是否为腐败梭菌，PCR扩增反应体系如表1所示。

表 1 PCR反应体系

名称	体积 (μL)
DNA模版	1
csa_U1-F (10 μM)	0.4
csa_L1-R (10 μM)	0.4
2×Repid Taq Master Mix	10
ddH ₂ O	8.2

成功扩增出腐败梭菌 α 毒素csa基因全长(1333 bp),且测序结果正确的细菌培养物,可用于腐败梭菌ELISA检测方法的应用。

6.4 腐败梭菌间接 ELISA 检测方法的建立

6.4.1 包被抗原的制备

将鉴定成功的腐败梭菌菌落接种于上述培养基,在37℃厌氧条件(厌氧环境气体组成体积比为:氮气78%、氢气8%、二氧化碳和氩气按体积比1:1组成的混合气体14%)下静置培养12h~24h,将腐败梭菌培养物12,000 rpm,离心5 min,收集菌体。用PBS缓冲液洗涤菌体沉淀三次,用碳酸盐缓冲液重悬菌体,制成细菌悬液,此即为包被抗原。

6.4.2 包被抗原

用抗原包被液将腐败梭菌悬液稀释至OD_{600nm}数值为0.06,包被酶标板,每孔加入100 μL,4℃过夜包被。

6.4.3 封闭

取出酶标板,弃液拍干,用PBST溶液洗涤3次后,加入5%脱脂奶粉作为封闭液,200 μL/孔,37℃封闭2h。

6.4.4 加入阴、阳性血清和待检血清

用PBST溶液洗涤3次后,加入用样品稀释液按1:1000稀释的腐败梭菌阴、阳性血清,100 μL/孔,37℃孵育1h。对血清样本进行检测时,待检血清样本也是在此步骤加入,稀释度与阴、阳性血清的稀释度相同。

6.4.5 加入酶标二抗

孵育后的样品,用PBST溶液洗涤3次,分别加入用二抗稀释液按1:8000稀释的HRP标记的兔抗绵羊IgG酶标二抗,100 μL/孔,37℃孵育1h。

6.4.6 显色

用PBST溶液洗涤3次,加入TMB底物显色液100 μL/孔,37℃避光反应15 min。

6.4.7 终止显色,测定样品吸光度

用2 M的H₂SO₄溶液100 μL/孔来终止反应,在450 nm处读取吸光值。

7 试验成立条件

阳性对照在450 nm的OD值 $\geq 0.968 \pm 0.014$,阴性对照的OD_{450nm}值 $< 0.230 \pm 0.008$,则试验结果成立;否则结果不成立。

8 间接 ELISA 方法标准曲线的建立

根据已建立好的腐败梭菌间接ELISA检测方法操作程序，对腐败梭菌阳性血清进行二倍倍比稀释，将其与阴性样品和空白孔分别进行检测，反应完毕后测定OD_{450nm}值。以腐败梭菌阳性血清浓度为横坐标，OD_{450nm}值为纵坐标绘制曲线图；根据曲线图，选择最佳线性范围，以浓度的自然对数LN(x)为横坐标，OD_{450nm}值为纵坐标绘制标准曲线。此方法最低检测线为12.34 ng/mL。该标准曲线线性范围理想，可根据标准曲线计算待测血清浓度。

9 样品结果判定

检测结果的判定标准为：计算阴性样品平均值(\bar{x})与标准差(SD)，求得 $\bar{x}+3SD$ 为阳性临界值， $\bar{x}+2SD$ 为阴性临界值；若待测血清的OD_{450nm}值 $>\bar{x}+3SD$ ，则结果判定为阳性；若待测血清的OD_{450nm}值 $<\bar{x}+2SD$ ，则结果判定为阴性；若待测血清的OD_{450nm}值介于 $\bar{x}+3SD$ 和 $\bar{x}+2SD$ 之间，则判定为可疑样品。可疑样品重复检测后的数值仍在此区间，则判断为阴性。

10 其他要求

10.1 抗原包被浓度有且仅为OD_{600nm}=0.06，增加结果的可靠性和准确性。

10.2 封闭条件仅为37°C封闭2 h，增加结果的可靠性。

10.3 酶标二抗稀释倍数仅为1:8000，且在此基础上，孵育时间准确设置为1 h，避光反应时间有且仅为15 min，这增加了结果的准确性和可靠性。

10.4 腐败梭菌阳性血清和腐败梭菌阴性血清和待检血清的稀释倍数(1:1000)，这是经过反复验证、严密筛选后得到的结果。试剂盒所用腐败梭菌相关血清为申请人制备的血清，有特异性，其本身为不可替代产品。



附录A
(规范性附录)
试验所用试剂的配制

A.1 抗原包被液:

NaHCO₃ 1.465 g

Na₂CO₃ 0.795 g

将NaHCO₃和Na₂CO₃溶于400 mL去离子水并定容至500 mL，用NaOH调PH值至9.5。

A.2 封闭液:

脱脂奶粉 1 g

将脱脂奶粉充分溶解于20 mL PBS缓冲液。

A.3 洗涤液（含0.05%Tween 20的PBST溶液）:

pH为7.2的PBS缓冲液（0.01 mol/L） 1 L

Tween20 500 μL

向PBS缓冲液中加入Tween20，充分混匀。

A.4 样品稀释液（PBS磷酸盐缓冲液）:

KCl 0.2 g

NaCl 8 g

KH₂PO₄ 0.27 g

Na₂HPO₄ 1.42 g

加入800 mL去离子水，搅拌溶解，将pH调至7.4后定容至1 L，高温高压灭菌，室温保存。

A.5 酶标二抗:

HRP标记的兔抗绵羊IgG酶标二抗。

购自北京聚合美生物技术有限公司。

A.6 TMB底物显色液:

购自天根生化科技有限公司。

A.7 终止液:

浓H₂SO₄ 13.8 mL

将浓H₂SO₄加入至300 mL去离子水，并定容到500 mL。