

T/CVDA

团 体 标 准
T/CVDA 2-2022

动物新型冠状病毒中和抗体检测技术

Detecting technique of neutralization antibody against SARS-CoV-2 in animals

2022 - 07 - 19 发布

2022 - 07 - 25 实施

中国兽药协会 发布

目 录

目 录	1
前 言	2
1 范围	3
2 规范性引用文件	3
3 符号和缩略语	3
4 试剂和材料	3
5 器材和设备	4
6 动物血清	4
6.1 安全防护	4
6.2 血清采集	4
7 PRNT 实验操作	4
7.1 安全防护	4
7.2 材料准备	4
7.2.1 病毒繁殖	5
7.2.2 毒价测定	5
7.2.3 细胞	5
7.2.4 血清灭活	5
7.3 检测操作	5
7.3.1 对照设置	5
7.3.2 血清稀释	5
7.3.3 病毒与血清中和	6
7.3.4 接种细胞	6
7.3.5 结果判定	6
附录 A	7
A.1 培养液	7
A.2 稀释液	7
A.3 细胞分散液	7
A.4 磷酸盐缓冲液(PBS)	7
附录 B	8
B.1 材料和试剂	8
B.2 方法	8
B.2.1 嵌合 SARS-CoV-2 S 蛋白重组水泡性口炎病毒的构建与拯救	8
B.2.2 重组病毒的传代与毒价测定	9
B.2.3 重组病毒的鉴定	9
B.2.4 rVSV Δ G-nCoV-S-EGFP 为抗原的中和实验的回归分析	9

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2020给出的规则起草。

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。

本标准由中国兽药协会提出并归口管理，由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所起草。

本标准主要起草单位：中国农业科学院哈尔滨兽医研究所，哈尔滨医科大学，东北林业大学。

本标准主要起草人：步志高、葛金英、王永、王晓龙、山丹、王喜军。

本标准为首次发布。

动物新型冠状病毒中和抗体检测技术

1 范围

本标准规定了用于动物新型冠状病毒血清中和抗体测定的实验操作方法及结果判定标准。
本标准适用于动物血清中新型冠状病毒中和抗体的定性检测和定量测定。

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 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。

GB/T 6682 2008 分析实验室用水规格和试验方法。

GB 19489 2008 实验室 生物安全通用要求。

3 符号和缩略语

下列符号和缩略语适用于本标准。

SARS-CoV-2：新型冠状病毒（Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2）；

Vero E6：非洲绿猴肾细胞（African green monkey kidney cell）；

rVSVΔG-nCoV-S-EGFP：表达绿色荧光蛋白的新型冠状病毒纤突蛋白 S 嵌合水泡性口炎病毒；

TCID₅₀：半数组织培养感染量（Tissue Culture Infective Dose）；

BSL-2：生物安全2级实验室（Biosafety Laboratory Level-2）；

BSL-3：生物安全3级实验室（Biosafety Laboratory Level-3）；

PRNT：噬斑减少中和试验（plaque-reduction neutralization test）；

DMEM：Dulbecco 改良的Eagle培养基（Dulbecco's Modified Eagle's Medium）；

PBS：磷酸盐缓冲液（Phosphate-Buffered Saline）；

PFU：噬斑形成单位（Plaque Forming Unit）；

FFU：荧光灶单位（Fluorescence Focus Units）；

FBS：胎牛血清（Fetal Bovine Serum）。

4 试剂和材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

4.1 水：GB/T 6682-2008，二级水。

4.2 新型冠状病毒抗体阴性血清，由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所制备、鉴定并保存。

4.3 新型冠状病毒抗体阳性血清，由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所制备、鉴定并保存。

4.4 含10% FBS的DMEM液培养基（见A.1）。

4.5 含2% FBS的DMEM液培养基（见A.2）。

4.6 细胞分散液（0.25%胰酶）（见A.3）。

4.7 磷酸盐缓冲液（PBS）（见A.4）。

4.8 Vero E6细胞。

4.9 rVSVΔG-nCoV-S-EGFP病毒。

4.10 胎牛血清（FBS）。

4.11 青-链霉素溶液。

5 器材和设备

5.1 移液器，50 μL~300 μL（±2%）。

5.2 96孔细胞培养板。

5.3 37℃，5%二氧化碳培养箱。

5.4 倒置显微镜。

5.5 普通冰箱和超低温冰箱。

5.6 细胞计数器。

5.7 20 μL~200 μL 吸头。

5.8 BSL-2级生物安全柜。

5.9 倒置荧光显微镜。

6 动物血清

6.1 安全防护

进行血液样本采集的人员应采取佩戴口罩、手套，着长袖工作服等防护措施。

6.2 血清采集

无菌采集动物血液，室温或37℃静置60 min。4℃放置1 h至过夜后，6000 r/min离心5 min，收集血清，-20℃以下保存待检。

样品采集应详细记录动物品系、年龄、免疫史、时间、地点、主人姓名与联系方式等信息。

7 PRNT 实验操作

7.1 安全防护

本检测应在满足 GB19489-2008 的 BSL-2 级生物安全实验室内进行。进行本检测的人员应采取佩戴口罩、手套，着长袖工作服等防护措施。

7.2 材料准备

7.2.1 病毒繁殖

将 rVSVΔG-nCoV-EGFP 接种于 Vero E6 单层细胞，37℃ 吸附 1h 后加入维持液，置 5% 二氧化碳（CO₂）培养箱培养，逐日观察。培养 48h 或待绿色荧光扩散达 90% 以上，收获病毒上清，分装成 1mL/瓶，置 -70℃ 保存备用。

7.2.2 毒价测定

将收获的病毒悬液在 96 孔板上做 10⁻¹~10⁻⁸ 稀释，每个稀释度作 8 孔，每孔加入病毒悬液 50μL，加入细胞悬液 100 μL（每毫升含 3×10⁵ 个细胞），每块 96 孔板设 8 孔细胞对照。置 5%CO₂ 培养箱 37℃ 培养，培养 48h 后观察绿色荧光并记录。按 Reed-Muench 方法计算出病毒悬液的毒价（TCID₅₀/50μL）。

7.2.3 细胞

按常规方法用含 10%FBS 的 DMEM 液培养 Vero E6 细胞，1 个 75 cm² 的细胞培养瓶（20 mL 培养液）细胞培养 48 h 后，可以用于 4 块 96 孔（每孔细胞数约为 3×10⁴ 细胞/孔）细胞培养板的检测。

7.2.4 血清灭活

阳性血清、阴性血清、待测血清在 56℃ 下灭活 30 min。灭活时，将血清样本放在 56℃ 恒温水浴箱内，水面要高于血清液面，但不要超过样品管高度。

7.3 检测操作

7.3.1 对照设置

- 细胞对照：设 4 孔正常细胞对照，即每孔加细胞悬液 100μL（每毫升 3×10⁵ 个细胞）。
- 阴性血清对照：设 4 孔阴性对照，每孔加阴性血清和 100TCID₅₀/50μL 病毒悬液各 50μL，再加入细胞悬液 100μL（每毫升含 3×10⁵ 个细胞）。
- 病毒回归对照：将病毒用稀释液稀释成 100、10、1、0.1TCID₅₀/50μL，每个稀释度作 4 孔，每孔加入 50 μL 病毒悬液，每孔补充稀释液 50 μL，再加入细胞悬液 100 μL（每毫升含 3×10⁵ 个细胞）。
- 阳性对照血清：将阳性血清作 1:4、1:8、1:16、1:32、1:64 稀释，每个稀释度作 4 孔，每孔加各稀释度阳性血清和 100TCID₅₀/50μL 病毒悬液各 50 μL，再加入细胞悬液 100 μL（每毫升含 3×10⁵ 个细胞）。
- 血清毒性对照：每份被检血清应按稀释度各设 1 孔毒性对照，每孔加各稀释度血清 50 μL、稀释液 50 μL 和细胞悬液 100 μL。

7.3.2 血清稀释

将每份被检血清从 1:4 开始连续做 2 倍倍比稀释，直到 1:4096。每个稀释度作 6 个孔，每孔加各稀

T/CVDA 2 —2022
释度血清 50 μL 。

7.3.3 病毒与血清中和

第 1 孔作为血清毒性对照，加入稀释液 50 μL 和细胞悬液 100 μL （每毫升含 3×10^5 个细胞），已确定血清样本完全灭活。第 2 孔~第 6 孔为正式试验孔，每孔加入病毒悬液 50 μL （100TCID₅₀/50 μL ），振荡 3min~5min，置 37℃ 中和 60 min（不超过 90 min）。

7.3.4 接种细胞

将培养 48 h 的 Vero E6 细胞用 PBS 淋洗一次，弃去 PBS 后再用胰酶-EDTA 液消化细胞，待细胞圆缩且部分脱落时，加入培养液吹打分散细胞，分散均匀的细胞进行细胞计数，用培养液将细胞稀释至每毫升含 3×10^5 个细胞。待测血清样品测定板每孔加细胞悬液 100 μL （每毫升含 3×10^5 个细胞）。置 5%CO₂ 培养箱 37℃ 培养，24h 后观察绿色荧光信号并记录。

7.3.5 结果判定

当病毒回归对照 100、10、1TCID₅₀/50 μL 全部出现绿色荧光信号，0.1TCID₅₀/50 μL 无绿色荧光信号，阳性血清对照、阴性血清对照、正常细胞对照、血清毒性对照全部成立时，方可进行判定。

判定时间为细胞培养 24h~72h。

细胞孔无表达绿色荧光判为中和阳性，表达绿色荧光判为中和阴性。记录被检血清每个稀释度对应细胞孔的阴性和阳性孔数，按照 Reed-Muench 方法计算出血清的中和抗体滴度，当中和抗体滴度 $\geq 3.5\log 2$ 时判为血清中和抗体阳性。

附录 A

(规范性附录) 溶液配制

A.1 培养液

DMEM 培养基，加入 10%胎牛血清，过滤除菌。

A.2 稀释液

DMEM 培养基，加入 2%胎牛血清，过滤除菌。

A.3 细胞分散液

胰酶	2.5 g
乙二胺四乙酸二钠 (EDTA)	0.2 g
无钙镁 PBS	1000 mL

过滤除菌。

A.4 磷酸盐缓冲液(PBS)

称取氯化钠85.00 g, 磷酸氢二钠15.49 g, 磷酸二氢钠2.03 g, 加去离子水溶解, 定容至10 L, 以2 mol/L 氢氧化钠溶液调至pH 7.4。高压灭菌后室温保存。

附录 B

(资料性附录)

rVSVΔG-nCoV-EGFP 病毒的构建与鉴定

B.1 材料和试剂

B.1.1 病毒株

水泡性口炎病毒 (Vesicular Stomatitis Virus, VSV) 反向遗传操作系统由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所重要人兽共患病与烈性外来病创新团队建立并保存。SARS-CoV-2 小鼠适应株 HRB26M 是由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所重要人兽共患病与烈性外来病创新团队分离鉴定并保存。

B.1.2 细胞与质粒

BHK 细胞、Vero E6 细胞由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所重要人兽共患病与烈性外来病创新团队保存、培养。细胞培养液为含 10% 胎牛血清的 DMEM。表达绿色荧光蛋白的重组 VSV 全基因组克隆质粒 pCI-VSVFL-EGFP 及辅助质粒 pCI-NP、pCI-P、pCI-L 由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所重要人兽共患病与烈性外来病创新团队构建、保存。

B.1.3 试剂

高保真 DNA 聚合酶 (Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase)、快速克隆试剂盒 (ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit) 购自南京诺维赞生物科技股份有限公司。X-tremeGENE™ 9 DNA 转染试剂购自 Merck 公司。抗 SARS-CoV-2 S 蛋白多克隆抗体、抗 SARS-CoV-2 S 蛋白单克隆抗体由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所重要人兽共患病与烈性外来病创新团队制备。红外荧光标记的驴抗鼠 IgG 购自 Life technologies 公司。胎牛血清、DMEM 均购自 Gibco 公司; TRITC 标记的山羊抗鼠 IgG 抗体购自 Sigma 公司。

B.2 方法

B.2.1 嵌合 SARS-CoV-2 S 蛋白重组水泡性口炎病毒的构建与拯救

在表达绿色荧光的重组病毒 rVSV-EGFP 全基因组克隆 pCI-VSVFL-EGFP 的基础上, 用限制性内切酶 Mlu I /Nhe I 双酶切、线性化 pCI-VSVFL-EGFP, 胶回收纯化线性载体。根据 SARS-CoV-2 S 蛋白基因序列, 设计 SARS-CoV-2 S 蛋白基因替换 VSV 病毒 G 蛋白基因的引物。采用 PCR 方法, 以 SARS-CoV-2 S 基因为模板, 用引物扩增带有 VSV-G 蛋白基因两端同源臂的 SARS-CoV-2 S 基因, 并进行胶回收纯化。利用一步法快速克隆试剂盒, 将 SARS-CoV-2 S 基因顺序克隆至载体 pCI-VSVFL-EGFP 的 Mlu I /Nhe I 位点。含有 SARS-CoV-2 S 蛋白基因的重组全基因组克隆质粒命名为 pCI-VSVΔG-nCoV-EGFP。

BHK 细胞接种于 35 mm 六孔板中, 过夜生长。重组质粒 pCI-VSVΔG-nCoV-EGFP 及辅助质粒 pCI-NP、pCI-P、pCI-L、pCI-G, 采用脂质体转染的方法共转染 BHK 细胞。转染 8~12 h 后, 换成新鲜的完全培养基, 37 °C 继续孵育, 间隔 72 h 更换新鲜培养液。每日荧光显微镜观察细胞绿色荧光表达情况, 待绿色荧光密度达 50% 以上时, 收集细胞培养上清, 经分装后 -70 °C 冻存, 重组病毒命名为 rVSVΔG-nCoV-EGFP, 重组病毒为 F1 代。

B. 2. 2 重组病毒的传代与毒价测定

将对数生长期的 Vero E6 细胞以 3×10^5 /mL 接种 6 孔细胞培养板，过夜培养。取重组病毒 rVSVΔG-nCoV-EGFP，10 倍稀释后接种 Vero E6 细胞，以含有 10% FBS 的 DMEM 培养基为生长培养基，每日观察荧光。当绿色荧光密度达 90% 以上时收取上清，此为重组病毒 F2 代，病毒分装后储存于 -70°C 备用。

将对数生长期的 Vero E6 细胞接种 96 孔板，过夜培养。将 rVSVΔG-nCoV-EGFP 做 $10^{-1} \sim 10^{-8}$ 稀释，稀释后的病毒悬液接种 96 孔板 Vero E6 细胞，每个稀释度作 5 孔，每孔 50 μL ，每块 96 孔板设 8 孔细胞对照。置 5% CO_2 培养箱 37°C 培养，培养 48h 后观察绿色荧光并记录。按 Reed-Muench 方法计算出病毒悬液的毒价 ($\text{TCID}_{50}/50\mu\text{L}$)。

B. 2. 3 重组病毒的鉴定

取重组病毒 rVSVΔG-nCoV-EGFP，提取总 RNA 进行 RT-PCR 鉴定。目的片段长度为 4200bp，PCR 片段序列应与目的序列一致。

重组病毒 rVSVΔG-nCoV-EGFP，按照 MOI 为 0.01 的比例感染玻底皿中过夜培养的 Vero E6 细胞，rVSV-EGFP 接种细胞作为对照。48h 后以 3% 多聚甲醛固定细胞，以鼠抗 SARS-CoV-2 S 单克隆抗体为一抗，TRITC 标记的山羊抗鼠 IgG 为二抗，对 SARS-CoV-2 S 蛋白表达进行 IFA 检测。SARS-CoV-2 S 蛋白应呈红色荧光，且与病毒自身表达的绿色荧光重叠。

重组病毒 rVSVΔG-nCoV-EGFP 按照 MOI 为 0.5 的比例感染 Vero E6 细胞，rVSV-EGFP 接种细胞作为对照。48h 后收取并裂解细胞，蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳并转印至 PVDF 膜，以鼠抗 SARS-CoV-2 S 单克隆抗体为一抗，红外标记的山羊抗鼠 IgG 为二抗，对 SARS-CoV-2 S 蛋白表达进行 Western-blot 检测。SARS-CoV-2 S 单克隆抗体应仅与 rVSVΔG-nCoV-EGFP 感染细胞样品发生特异性反应，条带为 130 kD 以上，rVSV-EGFP 感染的细胞对照样品无反应。

B. 2. 4 rVSVΔG-nCoV-EGFP 为抗原的中和实验的回归分析

取阳性血清，阴性血清和以 SARS-CoV-2 小鼠适应株 HRB26M 为抗原，确定中和抗体效价的被检血清，以 rVSVΔG-nCoV-EGFP 为抗原，进行平行试验，检测得出中和抗体滴度数据与原有数据进行线性回归统计分析，皮尔逊系数 R 在 0.6~0.8 之间，为强相关。