

T/CVDA

团 体 标 准

T/CVDA 3—2022

动物埃博拉病毒中和抗体检测技术

Detecting technique of neutralization antibody against Ebola virus in animals

2022 - 07 - 19 发布

2022 - 07 - 25 实施

中国兽药协会 发布

目录

前言	III
1 范围	4
2 规范性引用文件	4
3 缩略语	4
4 试剂和材料	4
5 器材和设备	5
6 动物血清	5
6.1 安全防护	5
6.2 血清采集	5
7 PRNT 实验操作	5
7.1 安全防护	5
7.2 材料准备	5
7.2.3 细胞	6
7.2.4 血清灭活	6
7.3 检测操作	6
7.3.1 对照设置	6
7.3.3 病毒与血清中和	6
7.3.4 接种细胞	6
8 结果观察与判定	7
8.1 观察顺序	7
8.2 荧光观察结果判定	7
8.2.2 结果判定与效价计算	7
附录 A	8
A.1 磷酸盐缓冲液 (PBS)	8
A.2 含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液	8
A.3 含 2%胎牛血清的 DMEM 培养液	8
A.4 细胞分散液	8
附录 B	9
B.1 材料和试剂	9
B.2 方法	9
B.2.1 嵌合 EBOV GP 蛋白重组水泡性口炎病毒的构建与拯救	9
B.2.2 重组病毒的传代	10
B.2.3 重组病毒鉴定	10
B.2.4 重组病毒的毒价测定	10

前 言

本标准参照GB/T 1.1-2020给出的规则起草。

本标准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、东北林业大学、哈尔滨国生生物科技股份有限公司。

本标准主要起草人：步志高、王翀、温志远、葛金英、柴洪亮、刘霄磊。

本标准为首次发布。

动物埃博拉病毒中和抗体检测技术

1 范围

本标准规定了用于动物埃博拉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埃博拉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 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

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

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

EBOV：埃博拉病毒（Ebola virus）；

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

VSVΔG-EBOVGP-EGFP：表达绿色荧光蛋白的埃博拉病毒糖蛋白GP嵌合水泡性口炎病毒；

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

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

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

BSL-4：生物安全4级实验室（Biosafety Laboratory Level-4）；

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）；

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 埃博拉病毒阴性小鼠血清，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 埃博拉病毒阳性小鼠血清，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 磷酸盐缓冲液（PBS）（见A.1）。

4.5 含10% FBS的DMEM培养基（见A.2）。

4.6 含2% FBS的DMEM培养基（见A.3）。

4.7 Vero E6细胞。

4.8 VSVΔG-EBOVGP-EGFP病毒。

4.9 胎牛血清（FBS）。

4.10 细胞分散液（0.25%胰酶）（见A.4）。

4.11 青-链霉素溶液。

5 器材和设备

5.1 移液器，50 μ l~300 μ l（ $\pm 2\%$ ）。

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 μ L~200 μ L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，1000 r/min 离心 5 min，收集上清，-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 VSV Δ G-EBOVGP-EGFP 接种于 Vero E6 单层细胞，37℃吸附 1 h 后，不弃去吸附液，加入维持液，置 5%二氧化碳（CO₂）培养箱培养，逐日观察。培养 48 h 或待绿色荧光密度达 90%以上，收获病毒上清，分装成 1 mL/瓶，置-70℃保存备用。

7.2.2 毒价测定

7.2.2.1 将病毒在 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 50 μ L, 加入细胞悬液 100 μ L (每毫升含 3×10^5 个细胞), 每块 96 孔板设 8 孔细胞对照。

7.2.2.2 置 5%CO₂ 培养箱 37℃ 培养, 48 h 后观察绿色荧光并记录。

7.2.2.3 按 Reed-Muench 法计算病毒的毒价 (TCID₅₀/mL)。

7.2.3 细胞

按常规方法用含 10%FBS 的 DMEM 培养液培养 Vero E6 细胞, 1 个 T75 细胞培养瓶(含 15 mL 细胞培养液) 培养细胞 48 h 后, 可以用于 4 块 96 孔 (每孔细胞数约为 3×10^4 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 30 min 灭活补体。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 100 μ L (每毫升含 3×10^5 个细胞)。

——阴性血清对照: 设 4 孔阴性对照, 每孔加阴性血清和 100TCID₅₀/50 μ L 病毒悬液各 50 μ L, 再加入细胞悬液 100 μ L (每毫升含 3×10^5 个细胞)。

——病毒回归对照: 将病毒用含 2% FBS 的 DMEM 培养液稀释成 100、10、1、0.1TCID₅₀/50 μ L, 每个稀释度作 4 孔, 每孔加入 50 μ L 病毒悬液, 每孔补充含 2% FBS 的 DMEM 培养基 50 μ L, 再加入细胞悬液 100 μ L (每毫升含 3×10^5 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 100TCID₅₀/50 μ L 病毒悬液各 50 μ L, 再加入细胞悬液 100 μ L (每毫升含 3×10^5 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 μ L、含 2% FBS 的 DMEM 培养基 50 μ L 和细胞悬液 100 μ L。

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, 每孔加各稀释度血清 50 μ L。

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 μ L 和细胞悬液 100 μ L (每毫升含 3×10^5 个细胞)。第 2 孔~第 6 孔为正式试验孔, 每孔加入病毒悬液 50 μ L (100TCID₅₀/50 μ L), 震荡 3 min~5 min, 置 37℃ 中和 60 min (不超过 90 min)。

7.3.4 接种细胞

7.3.4.1 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。

7.3.4.2 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。

7.3.4.3 每个检测批次除了需要待测血清样品测定板若干以外, 还需设阳性血清对照板孔和阴性血清对照板孔各 4 孔。

7.3.4.4 向 7.3.3 中病毒与血清中和的试验孔中加细胞悬液 100 μL (每毫升含 3×10^5 个细胞)。

7.3.4.5 置 5% CO_2 培养箱 37℃ 培养。

7.3.4.6 培养 48 h 后观察绿色荧光信号并记录。

8 结果观察与判定

8.1 观察顺序

按病毒对照孔、血清对照孔、待测血清孔顺序观察。

8.2 荧光观察结果判定

8.2.1 试验成立条件

在倒置荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白荧光灶, 观察每孔所有视野, 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 48 h 后。

8.2.2 结果判定与效价计算

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 48h。

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 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。

A. 2 含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液

无菌量取DMEM 培养基445 mL，加入胎牛血清50 mL、青-链霉素溶液5 mL。4℃保存。

A. 3 含 2%胎牛血清的 DMEM 培养液

无菌量取DMEM 培养基485 mL，加入胎牛血清10 mL、青-链霉素溶液5 mL。4℃保存。

A. 4 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。

附录 B

（资料性附录）

VSVΔG-EBOVGP-EGFP 病毒的构建、拯救与鉴定

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实验室建立，相关质粒由该实验室保存。

B.1.2 细胞与质粒

HEK293 细胞、VeroE6 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-N、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。

选择 EBOV 西非流行株 Makona 株（GeneBank: KP178538.1）的 GP 的基因序列并按照哺乳动物密码子偏嗜性对 GP 蛋白进行人工密码子优化并合成，同时在起始密码 ATG 前分别引入 VSV 基因起始、终止及 Kozak 序列。

B.1.3 试剂

VSV 全基因组克隆质粒 pCI-VSVFL 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。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 EBOV GP 蛋白单克隆抗体由购自北京义翘神州科技股份有限公司。罗丹明（TRITC）标记的山羊抗兔 IgG、辣根过氧化物酶（HRP）标记的山羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。胎牛血清购自赛默飞世尔科技有限公司。DMEM 培养液购自西格玛奥德里奇贸易有限公司。

B.2 方法

B.2.1 嵌合 EBOV GP 蛋白重组水泡性口炎病毒的构建与拯救

在质粒 pCI-VSVFL-EGFP 的基础上，用 Nhe I 限制性内切酶线性化该质粒，并进行胶回收。根据 EBOV GP 基因序列及线性化 pCI-VSVFL-EGFP 质粒序列设计同源重组引物。基于该同源重组引物，利用 PCR 技术扩增 EBOV GP 基因，并进行胶回收。利用一步法快速克隆试剂盒，将上述扩增获得的 EBOV GP 基因克隆至线性化质粒 pCI-VSVFL-EGFP 中，获得重组质粒 pCI-VSVΔG-EBOVGP-EGFP。

将 HEK293 细胞铺于六孔细胞板中，置于 5%CO₂、37℃培养箱中培养。待细胞板孔中细胞密度至 80%-90%时，采用脂质体转染法，将重组质粒 pCI-VSVΔG-EBOVGP-EGFP 及

辅助质粒 pCI-N、pCI-P、pCI-L 共转染至该细胞，转染后 48h 更换新鲜培养液。利用荧光倒置显微镜，每日观察转染细胞中绿色荧光基因的表达情况，并收获绿色荧光灶密度达 50% 的转染孔细胞上清，经分装后-70℃冻存，重组病毒命名为 VSVΔG-EBOVGP-EGFP，重组病毒为 F1 代。

B. 2. 2 重组病毒的传代

将对数生长期的 Vero E6 细胞 (3×10^5 个 /mL) 铺于 6 孔细胞板中，置于 5%CO₂、37℃ 培养箱中培养。待细胞长至单层且铺满孔底时，将 10 倍稀释的重组病毒 VSVΔG-EBOVGP-EGFP 接种于板孔中，以含有 2% FBS 的 DMEM 培养基为生长培养基。每日观察接毒孔细胞的荧光表达情况，当绿色荧光灶密度达 90% 时，收获细胞上清。

B. 2. 3 重组病毒鉴定

取重组病毒 VSVΔG-EBOVGP-EGFP，提取总 RNA 进行 RT-PCR 鉴定。目的片段长度为 2100 bp，PCR 片段序列应与目的序列一致。

用重组病毒 VSVΔG-EBOVGP-EGFP (MOI=0.01) 感染过夜培养的 Vero E6 细胞，VSV-EGFP 接种细胞作为对照。48 h 后以 3% 多聚甲醛固定细胞，以兔抗 EBOV GP 蛋白单克隆抗体为一抗，TRITC 标记的山羊抗兔 IgG 为二抗，IFA 检测 EBOV GP 蛋白的表达。EBOV GP 蛋白应呈红色荧光，且与病毒自身表达的绿色荧光重叠。

用重组病毒 VSVΔG-EBOVGP-EGFP (MOI=0.5) 感染 Vero E6 细胞，VSV-EGFP 接种细胞作为对照。48 h 后收取并裂解细胞，蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳并转印至 PVDF 膜，以兔抗 EBOV GP 单克隆抗体为一抗，HRP 标记的山羊抗兔 IgG 为二抗，Western blotting 检测 EBOV GP 蛋白的表达。EBOV GP 单克隆抗体应仅与 VSVΔG-EBOVGP-EGFP 感染细胞样品发生特异性反应，条带约为 120 kD，VSV-EGFP 感染的细胞样品无特异性条带或无特异性反应条带。

B. 2. 4 重组病毒的毒价测定

将 VSVΔG-EBOVGP-EGFP 做 10^{-1} ~ 10^{-8} 稀释，稀释后的病毒悬液加入 96 孔板，每孔加入 50 μL 病毒悬液，每孔补充含 2% FBS 的 DMEM 培养基 50 μL，再加入细胞悬液 100 μL (每毫升含 3×10^5 个细胞)，每个稀释度作 8 孔，每块 96 孔板设 8 孔细胞对照。置 5%CO₂ 培养箱 37℃ 培养，培养 48 h 后观察绿色荧光并记录。按 Reed-Muench 法计算病毒悬液的毒价 (TCID₅₀/mL)。