

广 东 省 地 方 标 准

DB44/T 2339—2021

实验动物 病原抗体液相芯片法定性分析

Laboratory animals Qualitative analysis of pathogen antibodies with suspension array
method

地方标准信息服务平台

2021 - 10 - 18 发布

2022 - 01 - 18 实施

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 缩略语 1

5 原理 2

6 主要设备和材料 2

7 试剂 2

8 方法 4

9 结果 5

附录 A（资料性） 抗原的制备..... 7

地方标准信息服务平台

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。

本文件由广东省科学技术厅提出并组织实施。

本文件由广东省实验动物标准化技术委员会（GD/TC 93）归口。

本文件起草单位：广东省实验动物监测所。

本文件主要起草人：王静、袁文、闵凡贵、吴瑞可、朱余军、伍妙梨、徐凤姣、罗银珠、何丽芳、练月晓、黄碧洪、张钰、丛峰、郭鹏举、黄韧。

地方标准信息服务平台

实验动物 病原抗体液相芯片法定性分析

1 范围

本文件规定了实验动物病原抗体的液相芯片定性分析方法。

本文件适用于基于液相芯片方法的实验动物病原抗体的定性分析。

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

GB/T 19495.2 转基因产品检测 实验室技术要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

液相芯片技术 suspension array technology

液相芯片技术是基于编码微球和流式技术的一种临床应用型的高通量发光检测技术，又被称为流式荧光术、悬浮阵列及xMAP技术等。它是在不同荧光编码的微球上进行抗原-抗体、酶-底物、配体-受体的结合反应及核酸杂交反应，通过红、绿两束激光分别识别微球编码和报告荧光来达到定性和定量的目的，一个反应孔内可以完成多达100种不同的生物学反应，是继基因芯片、蛋白芯片之后的新一代高通量多分子分析技术平台。

3.2

多重免疫荧光抗体检测 MFIA

在xMAP技术平台上建立的高通量抗体检测方法。通过将已知抗原偶联到不同编码荧光微球上，待测物中的特异性抗体与荧光微球抗原发生特异性结合，抗原抗体复合物可与相应的二抗荧光报告分子结合，最后通过荧光检测仪自动读取报告荧光和微球荧光编码，实现在同一个反应体系中监测多个靶抗体的目的。

4 缩略语

BSA 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin)

CPE 细胞病变效应 (cytopathic effect)

EDC 碳酰二亚胺 (ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride)

ELISA 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay)

MFI 中位荧光强度值 (median fluorescence intensity)

MFIA 多重免疫荧光试验 (multiplexed fluorometric immunoassay)

PBS 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline)

SA-PE 链霉亲和素-藻红蛋白 (streptavidin-R-phycoerythrin)

SPF 无特定病原体 (specific pathogen free)

Sulfo-NHS 硫代琥珀酰亚胺 (N-hydroxy sulfo succinimide sodium salt)

xMAP 多分子分析技术 (flexible multi-analyte profiling technology)

5 原理

液相芯片技术又称为微球悬浮点阵技术、流式荧光术、xMAP技术等,该方法以荧光微球作为反应载体,从而可在液相实现对核酸、蛋白质等生物分子的高通量分析。其技术原理为将直径为5.6 μM 的聚苯乙烯小球用荧光染色的方法进行编码,通过调节两种荧光染料的不同配比获得最多可达100种具有不同特征荧光光谱的微球,然后将每种编码微球共价交联上针对特定检测物的抗原、抗体或核酸探针等捕获分子。加入待检样本后,在液相条件下,靶分子与微球表面交联的捕获分子发生特异性结合,在一个反应孔内可以同时完成多达100种的不同反应。最后,微球随液流排成单列传送至液相芯片检测仪进行自动分析,分析仪通过红、绿两束激光,其中635 nm/10 mW的红色二极管激光激发微球中的分类荧光染料,确定被测物的特异性(定性);532 nm/13 mW的钪铝石榴石激光(YAC)激发结合在微球表面的报告荧光素(如藻红蛋白、Alexa532、Cy3等),确定被测物的量(定量),从而完成对反应的实时、定性和定量分析。

6 主要设备和材料

6.1 液相芯片检测仪。

6.2 高速离心机。

6.3 药品保存冰箱(4 $^{\circ}\text{C}$)。

6.4 超低温冰箱(-80 $^{\circ}\text{C}$)。

6.5 漩涡振荡器。

6.6 离心管磁力架。

6.7 96孔板磁力架。

6.8 96孔板水平振荡器。

6.9 超声波清洗器。

6.10 真空抽滤装置。

6.11 96孔细胞培养板。

6.12 蛋白低吸附离心管(1.5 mL)。

6.13 微量移液器:0.1 μL ~2 μL , 1 μL ~10 μL , 10 μL ~100 μL , 100 μL ~1000 μL 。

7 试剂

7.1 抗原

7.1.1 天然抗原

7.1.1.1 特异性抗原：将病毒接种至敏感细胞培养增殖（见附录 A 中的附表 A.1），当细胞病变达+++~++++时收获，冻融三次或超声波处理后，低速离心去除细胞碎片，上清液经超速离心浓缩，再进行蔗糖密度梯度离心，收集纯化抗原蛋白带，制成检测抗原。

7.1.1.2 细胞对照抗原：未接种病毒的相应细胞冻融破碎后，经低速离心去除细胞碎片而获得的上清液。

7.1.2 重组抗原

7.1.2.1 特异性重组抗原：选取免疫原性较好的抗原片段通过基因克隆表达及纯化获得重组抗原（见附录 A 中的附表 A.2），加入蛋白保护剂，分装保存于-80℃超低温冰箱待用。

7.1.2.2 表达系统对照抗原：将选用的表达系统按照同等诱导条件诱导空载体蛋白表达，收获空载体诱导菌，超声裂解，离心取裂解上清作为表达系统对照抗原。

7.2 二抗

二抗应选用以下两种之一：

- a) 生物素标记羊或兔抗小鼠、大鼠、豚鼠、地鼠、兔、犬或猴 IgG 抗体。用于检测相应动物血清抗体；
- b) 藻红素偶联的生物素标记羊或兔抗小鼠、大鼠、豚鼠、地鼠、兔、犬或猴 IgG 抗体。用于检测相应动物血清抗体。

7.3 SA-PE

链霉亲和素-藻红蛋白SA-PE。

7.4 荧光微球

表面带有羧基的特定编码荧光微球MagPlex Microspheres。

7.5 磁珠偶联试剂

硫代琥珀酰亚胺（Sulfo-NHS）；

碳酰二亚胺（EDC）；

激活缓冲液（Activation buffer）：0.1 M NaH₂PO₄, pH6.2；

偶联缓冲液（Coupling buffer）：50 mM MES, pH5.0；

储存缓冲液（PBS - TBN buffer）：PBS, 0.1%BSA, 0.02%Tween-20, 0.05% Sodium azide。

7.6 xMAP 反应液

磷酸盐缓冲液（PBS）：138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH7.4；

反应液/洗液（Assay/Wash buffer）：PBS, 1%BSA, pH7.4。

7.7 对照血清

7.7.1 阳性血清

用特异抗原免疫SPF小鼠、大鼠、豚鼠、地鼠或普通级兔、犬、猴所获得的抗血清；或自然感染恢复后的犬、猴血清。

7.7.2 阴性血清

SPF小鼠、大鼠、豚鼠、地鼠血清；或确认无相应病原感染的兔、犬、猴血清。

注：以上所用的试剂除特别注明者外均为分析纯，实验用水为双蒸水或去离子水，应符合GB/T 6682所规定一级水的要求。

8 方法

8.1 样品前处理

无菌采集动物血液约0.1 mL~0.5 mL，37℃放置1 h，或者4℃冰箱放置过夜，5 000 *g*离心5 min，分离上清待用。

8.2 磁珠活化

- 8.2.1 涡旋和超声各 20 s 悬浮磁珠，转移 5.0×10^6 磁珠到 1.5 mL 低吸附离心管中，记录磁珠编码。
- 8.2.2 置于磁力架上吸附 3 min，或 12 000 *g* 离心 3 min，沉淀磁珠。
- 8.2.3 置于磁力架上小心吸去上清，加入 100 μ L 双蒸水，于旋涡振荡器上震荡，再用 40 kHz 超声波仪处理 20 s，使微球充分分散。
- 8.2.4 再次置于磁力架上吸附 3 min，或 12 000 *g* 离心 3 min，沉淀磁珠。
- 8.2.5 置于磁力架上小心吸去上清，加入 80 μ L 激活缓冲液；涡旋和超声各 20 s 悬浮磁珠。
- 8.2.6 10 μ L 50 mg/mL 硫代琥珀酰亚胺（Sulfo-NHS）加入混悬的磁珠中。
- 8.2.7 取 10 μ L 50 mg/mL 碳酰二亚胺（EDC）加入混悬的磁珠中。
- 8.2.8 避光，室温轻摇孵育 20 min。
- 8.2.9 置于磁力架上吸附 3 min，或 12 000 *g* 离心 3 min，沉淀磁珠。
- 8.2.10 置于磁力架上小心吸去上清，加入 250 μ L 偶联缓冲液，涡旋和超声各 20 s 悬浮磁珠。
- 8.2.11 置于磁力架上吸附 3 min，或 12 000 *g* 离心 3 min，沉淀磁珠。
- 8.2.12 重复第 8.2.10、8.2.11 条步骤，洗涤磁珠共两次。
- 8.2.13 加入 100 μ L 相同浓度的偶联缓冲液，涡旋和超声各 20 s 悬浮磁珠。

8.3 抗原偶联

- 8.3.1 在活化好的悬浮磁珠中加入最适浓度的检测抗原，记录不同检测抗原各自对应的荧光编码。
- 8.3.2 加入偶联缓冲液，补齐至终体积 500 μ L。
- 8.3.3 涡旋和超声各 20 s 悬浮磁珠。
- 8.3.4 避光室温振荡混匀孵育 2 h。
- 8.3.5 置于磁力架上吸附 3 min，或 12 000 *g* 离心 3 min，沉淀磁珠。
- 8.3.6 置于磁力架上小心吸去上清，加入 500 μ L PBS-TBN，涡旋和超声各 20 s 悬浮磁珠，避光室温振荡混匀孵育 30 min。
- 8.3.7 置于磁力架上吸附 3 min，或 12 000 *g* 离心 3 min，沉淀磁珠。
- 8.3.8 置于磁力架上小心吸去上清，加入 1000 μ L PBS-TBN，涡旋和超声各 20 s 悬浮磁珠。
- 8.3.9 重复第 8.3.7、8.3.8 条步骤，洗涤磁珠两次。
- 8.3.10 置于磁力架上小心吸去上清，加入 250 μ L~1 000 μ L 磁珠储存液 PBS-TBN，涡旋和超声各 20s 悬浮磁珠。

8.3.11 微球计数：吸取适量标记磁珠，用 PBS 10 倍稀释后，血球计数板在普通显微镜下计数。根据公式：每个大格数 $\times 10^4 \times$ 稀释倍数 $\times$ 体积（mL），计算磁珠数量。

8.3.12 2℃~8℃低温避光保存偶联好的荧光微球抗原待用。

8.4 xMAP 免疫反应

8.4.1 所有试剂恢复到室温，所有的操作均应避光，可选用不透明离心管或用铝铂膜包裹遮光的离心管进行操作。

8.4.2 稀释待检血清：用血清稀释液将样本稀释 50 倍。

8.4.3 取出偶联好的荧光微球抗原，于旋涡震荡器上震荡，再用 40 khz 超声波仪处理 20 s，使磁珠充分分散。

8.4.4 荧光微球工作液的制备：按照所需检测的病原项目混合偶联抗原荧光磁珠，同时加入正常抗原对照磁珠。每个样品孔需加入检测磁珠 2500 个/种，用 xMAP 反应液 PBS-1% BSA 将荧光微球抗原稀释至终浓度为每种磁珠 50 个/ μ L，于旋涡震荡器上震荡 30 s，再用 40 khz 超声波仪处理 30 s，使磁珠充分混匀。

8.4.5 每个样品反应孔加入 50 μ L 混合好的荧光微球抗原。

8.4.6 每孔加入 50 μ L 稀释好的待检样本。

8.4.7 避光，室温，400 r/m 水平震荡孵育 60 min。

8.4.8 孵育结束，将 96 孔反应板置于 96 孔磁力板上吸附 3 min，弃去上清。

8.4.9 每孔加入 100 μ L PBS-1% BSA，置于 96 孔磁力板上吸附 3 min，弃去上清。

8.4.10 重复第 8.4.9 条步骤，洗磁珠两次。

8.4.11 每孔加入 100 μ L 生物素标记的二抗或 PE 标记二抗，终浓度为 1 μ g/ μ L~4 μ g/ μ L。

8.4.12 避光，室温，400 r/m 水平震荡孵育 60 min。

8.4.13 重复第 8.3.9 条步骤，洗磁珠两次。

8.4.14 加入 SA-PE：PBS-1% BSA 稀释 SA-PE 至 10 μ g/mL~12 μ g/mL，每孔加入 100 μ L（PE 二抗此步可省略）。

8.4.15 避光，室温，400 r/min 水平震荡孵育 30 min。

8.4.16 重复第 8.3.9 条步骤，洗磁珠两次。

8.4.17 每孔加入 100 μ L PBS-1% BSA，400 r/min 水平震荡 2 min。

8.5 液相芯片检测仪读取荧光

8.5.1 在 SA-PE 孵育时，打开液相芯片所有相关仪器，仪器开机预热 30 min。

8.5.2 按照液相芯片检测仪操作说明书，进行各个参数的设置。

8.5.3 每个样品上机时，应同时选择特定编码微球，并填写每种荧光微球对应病原微生物名称。

8.5.4 上样体积为 75 μ L，流速为快速，每种荧光微球设置计数为至少 50 个，计数时间为 60 s。

8.5.5 将准备好的待检样本放入液相芯片检测仪，并在软件界面进行相应的标注，开启检测。

8.5.6 反应结束，导出结果数据进行判读。

9 结果

9.1 数据有效性分析

每种特定编码微球个数不少于35个，空白对照荧光强度中位值（MFI）不高于100，阴性对照血清MFI值不高于500，阳性对照血清MFI值高于空白对照五倍以上。

9.2 阈值(Cutoff)确定

选取至少100份阴性动物血清（每个样品平行重复2次），分别读取MFI值并计算其平均值和标准差（standard deviation, SD）。根据Cutoff值公式：阴性样本平均MFI值 ± 3 SD，确定为该项目检测判定阈值（cutoff值）。

9.3 结果分析与定性判定

9.3.1 在阴性对照、阳性对照、空白对照成立的条件，进行结果判定。

9.3.2 关联某种病原微生物识别的特定编码微球在液相芯片检测仪中获得的特异抗原 MFI 值-正常抗原 MFI 值 $\geq$ Cutoff 值，判定该样本为该种病原微生物抗体阳性。

9.3.3 关联某种病原微生物识别的特定编码微球在液相芯片检测仪中获得的特异抗原 MFI 值-正常抗原 MFI 值 $<$ Cutoff 值，判定该样本为该种病原微生物抗体阴性。

地方标准信息服务平台

附录 A

(资料性)

抗原的制备

本附录中对实验动物大、小鼠、兔、犬、猴常见病原列出可选检测抗原。天然抗原的制备见表A.1，重组抗原的制备见表A.2。

表A.1 天然抗原的制备

病毒	细胞、鸡胚	收获时间 (day)	细胞病变
汉坦病毒 (HV)	E6	10~14	—
淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV)	Vero	7~10	+++~++++
鼠痘病毒 (ECT)	BHK21, Vero	2~3	++~+++
小鼠肝炎病毒 (MHV)	DBT, L929	2~4	+++~++++
仙台病毒 (SV)	鸡胚	3	+++~++++
呼肠孤病毒 III 型 (REO3)	BSC-1, BHK21	4~5	++++
小鼠肺炎病毒 (PVM)	BHK21	10~14	++~+++
小鼠脑脊髓炎病毒 (TMEV)	BHK21	5~6	++++
小鼠细小病毒 MVM 株 (MVM)	ME, 3T3	7~10	++++
小鼠腺病毒 (MAD)	MK, ME, 3T3	3~5	++++
多瘤病毒 (POLY)	ME, 3T3	10~14	+++~++++
大鼠细小病毒 KRV 株 (KRV)	RE	7~12	+++~++++
大鼠细小病毒 H1 株 (H1)	RE	7~12	+++~++++
大鼠冠状病毒 (RCV)	DBT, L929	2~3	+++~++++
兔轮状病毒 (RRV)	BHK21	6~7	+++~++++
犬细小病毒 (CPV)	FK81	3~5	+++~++++
犬病毒性肝炎病毒 (ICHV)	MDCK	3~4	+++~++++
犬瘟热病毒 (CDV)	Vero	8~10	+++~++++
猴逆转录病毒 (SRV)	Raji	10~14	细胞融合
猴免疫缺陷病毒 (SIV)	CM-174	10~14	细胞融合

注：MK-小鼠肾细胞；ME-小鼠胚细胞；RE-大鼠胚细胞。

表A.2 重组抗原的制备

检测项目	表达蛋白	表达系统
汉坦病毒（HV）	NP	大肠杆菌/昆虫杆状病毒
淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒（LCMV）	NP	大肠杆菌/昆虫杆状病毒
仙台病毒（SV）	NP, F	大肠杆菌/昆虫杆状病毒
小鼠肺炎病毒（PVM）	NP, G	大肠杆菌/昆虫杆状病毒
小鼠细小病毒 MVM 株（MVM）	NS, VP2	大肠杆菌/昆虫杆状病毒
小鼠细小病毒 MPV 株（MPV）	VP2	大肠杆菌/昆虫杆状病毒
大鼠细小病毒 KRV 株（KRV）	VP2	大肠杆菌/昆虫杆状病毒
大鼠细小病毒 H1 株（H1）	VP2	大肠杆菌/昆虫杆状病毒
大鼠细小病毒 RPV 株（RPV）	VP2	大肠杆菌/昆虫杆状病毒/合成肽段
大鼠细小病毒 RMV 株（RMV）	VP2	大肠杆菌/昆虫杆状病毒/合成肽段
小鼠流行性腹泻病毒（EDIM）	VP6	大肠杆菌/昆虫杆状病毒
鼠痘病毒（ECT）	B5R	大肠杆菌/昆虫杆状病毒
小鼠腺病毒（MAD）	VP1	大肠杆菌/昆虫杆状病毒
多瘤病毒（POLY）	VP1	大肠杆菌/昆虫杆状病毒
呼肠孤病毒 III 型（REO3）	S1	大肠杆菌/昆虫杆状病毒
小鼠肝炎病毒（MHV）	N	大肠杆菌/昆虫杆状病毒
小鼠脑脊髓炎病毒（TMEV）	VP1	大肠杆菌/昆虫杆状病毒
小鼠诺如病毒（MNV）	VP1	大肠杆菌/昆虫杆状病毒
小鼠巨细胞病毒（MCMV）	gH	大肠杆菌/昆虫杆状病毒
猴免疫缺陷病毒（SIV）	P27	大肠杆菌/昆虫杆状病毒
猴 T 淋巴细胞白血病病毒（STLV）	Gag	合成肽段
猴逆转录病毒（SRV）	Gag	大肠杆菌/昆虫杆状病毒
猴 B 型疱疹病毒（B virus）	glycoprotein	合成肽段
兔流行性出血热病毒（RHV）	VP60	大肠杆菌/昆虫杆状病毒

地方标准信息服务平台

广东省地方标准
实验动物 病原抗体液相芯片法定
性分析

DB44/T 2339—2021

*

广东省标准化研究院组织印刷
广州市海珠区南田路 563 号 1304 室
邮政编码：510220