

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4736—2025

猪基孔肯雅病毒感染诊断技术

Diagnostic techniques for swine chikungunya virus infection

2025-04-27 发布

中华人民共和国农业农村部 发布



目 次

前言 III

引言 IV

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 生物安全措施 1

6 临床诊断 1

 6.1 流行特点 1

 6.2 易感动物 1

 6.3 临床症状 1

 6.4 病理变化 2

 6.5 结果判定 2

7 样品采集与保存 2

 7.1 主要试剂 2

 7.2 采样器材 2

 7.3 样品采集 2

 7.4 样品保存 2

8 病毒分离 2

 8.1 仪器设备 2

 8.2 试剂材料 3

 8.3 样品处理 3

 8.4 试验方法 3

 8.5 结果判定 3

9 反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR) 3

 9.1 仪器设备 3

 9.2 试剂材料 4

 9.3 样品处理 4

 9.4 试验方法 4

 9.5 试验成立条件 5

 9.6 结果判定 5

10 荧光反转录-聚合酶链反应(荧光 RT-PCR) 5

 10.1 仪器设备 5

 10.2 试剂材料 5

 10.3 样品处理 5

 10.4 试验方法 5

 10.5 试验成立条件 6

 10.6 结果判定 6

11 微量中和试验 6

 11.1 仪器设备 6

11.2	试剂材料	6
11.3	试验准备	6
11.4	试验方法	7
11.5	试验成立条件	7
11.6	结果判定	7
12	竞争酶联免疫吸附试验(C-ELISA)	7
12.1	仪器设备	7
12.2	试剂材料	7
12.3	样品处理	8
12.4	试验方法	8
12.5	试验成立条件	9
12.6	结果判定	9
13	综合判定	9
附录 A(规范性)	样品保存、病毒分离及微量中和试验相关溶液的配制	10
附录 B(资料性)	CHIKV 分离物 CPE	11
附录 C(规范性)	反转录-聚合酶链反应溶液的配制	12
附录 D(资料性)	反转录-聚合酶链反应引物和探针序列及电泳结果	13
附录 E(规范性)	微量中和试验抗体效价和毒价测定及血清对照排列表	15
附录 F(规范性)	基孔肯雅病毒 C 和 E2 重组蛋白及高免血清的制备	18
附录 G(规范性)	竞争酶联免疫吸附试验用溶液的配制	21

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。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本文件起草单位：云南省畜牧兽医科学院、昆明医科大学、中国科学院动物研究所。

本文件主要起草人：王静林、杨振兴、何于雯、郑爱华、孟锦昕、李楠、李苏胜。



引 言

基孔肯雅病毒(chikungunya virus, CHIKV)为不分节段的单股正链 RNA 病毒,属于披膜病毒科(Togaviridae)甲病毒属(*Alphavirus*),是一种虫媒病毒。CHIKV 主要通过伊蚊叮咬人、猴和猪等哺乳动物进行传播,并引起基孔肯雅热(chikungunya fever, CHIK)。该病最初流行于非洲的热带和亚热带地区,并逐步扩散到南亚、东南亚、印度洋岛屿及美洲地区,属于一种蚊媒性人兽共患传染病。

CHIKV 于 1952 年 7 月在非洲的坦桑尼亚被首次确认,疾病流行地区不同村庄的平均感染率为 40%~50%。该病毒在非洲东部发现后,在乌干达又出现人感染病例。随后,该病毒在非洲撒哈拉以南多地被发现。1964 年,在津巴布韦的非人灵长类动物中检测到 CHIKV 抗体。随后一些研究证实,非人灵长类动物为该病毒的主要宿主,非洲伊蚊及其他一些树栖蚊媒为该病地方性流行的主要传播媒介。1964—1967 年,在泰国、马来西亚、菲律宾和印度等国的生猪养殖场和屠宰场采集的样品中均检测到 CHIKV 抗体。我国于 1986 年首次从云南省捕获的蝙蝠、白纹伊蚊和三带喙库蚊体内分离到 CHIKV。近年来,在我国南方地区的一些生猪养殖场采集的样品中检出 CHIKV 抗体,并存在零星散发病例。

在自然条件下,人、猴和猪等动物感染 CHIKV 均可出现临床症状,如人的发热、皮疹和关节痛,猴的高滴度的病毒血症,母猪的繁殖障碍和仔猪的肢体活动障碍。该病的发生有一定的季节性和地域性,与伊蚊的活跃期和活动范围有关,可呈现地方性流行或暴发流行。本文件的实施对提高猪基孔肯雅热的诊断和监测水平,及时采取防控措施,保护家畜健康和产业发展,将起到重要作用。

猪基孔肯雅病毒感染诊断技术

1 范围

本文件规定了猪基孔肯雅病毒感染的临床诊断、病毒分离、RT-PCR、荧光 RT-PCR、微量中和试验以及酶联免疫吸附试验等实验室诊断技术要求。

本文件适用于猪基孔肯雅病毒感染的诊断。

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）适用本文件。

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 缩略语

下列缩略语适用于本文件：

CHIKV：基孔肯雅病毒(chikungunya virus)

CPE：细胞病变效应(cytopathic effect)

Ct 值：每个反应管内的荧光信号循环数阈值(cycle threshold value)

EDTA：乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid)

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

HRP：辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase)

RT-PCR：反转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction)

TAE：三羟甲基氨基甲烷-乙酸-乙二胺四乙酸缓冲液(tris-acetic acid-edta buffer)

TMB：四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine)

5 生物安全措施

进行猪 CHIKV 感染的实验室诊断时，如动物剖检、样品采集与处理、核酸提取和病毒分离鉴定等，应按照 GB 19489 的规定执行。

6 临床诊断

6.1 流行特点

6.1.1 CHIKV 主要通过伊蚊(白纹伊蚊和埃及伊蚊)叮咬人、猴和猪等哺乳动物进行传播。

6.1.2 CHIKV 在猪中的暴发流行时间往往与伊蚊繁殖季节(夏秋季)相吻合，每年 6 月—9 月通常为该病流行期，气候湿热地区为高流行区域。

6.2 易感动物

家猪是 CHIKV 的易感动物，各种年龄和品种的猪均易感，主要危害妊娠母猪和仔猪。CHIKV 也可感染野猪。

6.3 临床症状

6.3.1 仔猪感染 CHIKV 后出现短暂的发热,一般潜伏期为 3 d~12 d,发病急骤,体温常迅速上升至 40℃~44℃,同时出现一个或多个关节剧烈疼痛,严重可致活动能力丧失。发热 2 d~3 d 后,或在身体躯干及四肢或背面出现斑、丘疹等,部分感染后不出现临床症状。

6.3.2 母猪感染 CHIKV 后以发热为主(体温>40℃),并出现高滴度的病毒血症,全身通红,烦躁,食欲下降,部分不出现临床症状,极少部分导致流产和早产。

6.3.3 成年猪感染 CHIKV 后很少或者不出现临床症状,临床症状以发热为主(体温>40℃),最高可达 44℃,食欲下降,1 周后体温恢复正常,其他临床症状也逐渐减轻。

6.4 病理变化

6.4.1 剖检病理变化:皮肤组织出现局部水肿、斑或丘疹,大部分淋巴结肿大。

6.4.2 组织病理学变化:肝部出现明显肝细胞水肿,肌肉中检测到的肌纤维变性及肌母细胞增生,关节腔滑膜遭到破坏并出现纤维蛋白渗出。

6.5 结果判定

6.5.1 在 CHIKV 流行地区,猪出现上述临床症状和病理变化,可初步判定为猪基孔肯雅热疑似病例。

6.5.2 疑似病例应按照 NY/T 541 规定的要求采集猪的全血、血清、脾脏及淋巴结等组织样品,进行实验室检测。

7 样品采集与保存

7.1 主要试剂

7.1.1 0.01 mol/L PBS(pH 7.4),按照附录 A 中的 A.1 配制。

7.1.2 50%甘油-PBS 保存液,按照 A.2 配制。

7.2 采样器材

解剖刀、剪刀、镊子、注射器(5 mL、10 mL)及针头、真空采血管(含 EDTA 或肝素钠抗凝剂)、离心管(2 mL、10 mL)、样品保存管、工作服、口罩、一次性手套、采样记录单、记号笔、防水标签、封口膜、冰袋等。

7.3 样品采集

7.3.1 全血样品采集

使用真空采血管(含 EDTA 和肝素钠抗凝剂)分别采集发病猪或疑似感染猪血液不少于 5 mL。

7.3.2 血清样品采集

采集发病猪或疑似感染猪全血不少于 5 mL,置于 4℃析出血清后,3 000 r/min 离心 15 min,取上层血清装入离心管中。

7.3.3 组织样品采集

无菌采集病死猪或扑杀猪的组织样品不少于 5 g。首选脾脏,其次为淋巴结、骨髓等组织。将所采集样品装入样品保存管,加入 50%甘油-PBS 保存液,使液面没过样品,加盖封口。

7.4 样品保存

采集的样品应保存于 4℃,并在 24 h~48 h 内运送至实验室用于检测及病毒分离,长期保存应置于-80℃冰箱。

8 病毒分离

8.1 仪器设备

8.1.1 二氧化碳培养箱(37℃)。

8.1.2 冰箱(4℃、-20℃、-80℃)。

8.1.3 倒置生物显微镜。

8.1.4 台式低温高速离心机。

8.1.5 微量可调移液器(0.5 μL~2.5 μL、1 μL~20 μL、20 μL~200 μL、100 μL~1 000 μL)及配套吸头。

8.1.6 低温组织匀浆机。

8.1.7 细胞培养用器皿(12孔、24孔细胞培养板或细胞培养瓶)。

8.2 试剂材料

8.2.1 青霉素,浓度为10 000 U/mL。

8.2.2 链霉素,浓度为10 000 μ g/mL。

8.2.3 两性霉素B,浓度为5 000 μ g/mL。

8.2.4 胰酶消化液,按照A.3配制。

8.2.5 细胞生长液与维持液,按照A.4配制。

8.2.6 细胞:仓鼠肾细胞(BHK-21)。

8.3 样品处理

8.3.1 组织样品

取猪脾、淋巴结各2 g,剪碎后加入10 mL的PBS(含青霉素2 000 U/mL、链霉素2 000 μ g/mL),将组织置于匀浆机中研磨,4℃冰箱中浸提4 h。取上清液2 mL用超声波裂解处理(100 μ A,1 min~2 min),3 000 r/min离心20 min,取上清液1 mL,加入4 mL灭菌双蒸水,混匀,采用0.22 μ m滤膜过滤除菌。经处理的样品如当天使用,使用前置于4℃保存,剩余样品置于-80℃保存备用。

8.3.2 血液样品

取肝素钠抗凝血200 μ L,加入1 mL PBS,1 000 r/min离心10 min;细胞沉淀再用1 mL的PBS洗涤2次,离心弃上清液;细胞沉淀中加入900 μ L灭菌双蒸水,充分振荡,使红细胞完全胀裂。经处理的样品当天使用,使用前置于4℃保存,剩余样品置于-80℃保存备用。

8.4 试验方法

8.4.1 单层细胞制备

用细胞生长液稀释BHK-21细胞,细胞终浓度为每毫升 1×10^6 个细胞。将稀释的细胞加入24孔细胞培养板,1 mL/孔,置于37℃、5%CO₂培养箱中培养长成单层。

8.4.2 样品接种

待BHK-21长成单层细胞后,用无菌PBS洗涤3次,每孔接种200 μ L按8.3.1处理的组织样品,或50 μ L按8.3.2处理的血液样品,置于37℃吸附60 min后弃掉液体,每孔加入1 mL的细胞维持液,置于37℃、5%CO₂培养箱中培养,每天观察CPE,连续观察7 d。

8.4.3 培养物盲传

样品初次接种细胞培养7 d后,不论有无CPE,均应将每孔内细胞液取100 μ L,移入按照8.4.1制备的新细胞板对应的孔内(第2代),置于37℃、5%CO₂培养箱中培养7 d,每天观察CPE。每份样品的细胞培养物应盲传3代。

8.5 结果判定

8.5.1 培养物盲传3代未见CPE(见附录B中的图B.1 a),可判定为病毒分离阴性。

8.5.2 初次接种样品或盲传后出现CPE(见图B.1 b),可初步判定为病毒分离阳性。应将出现CPE的细胞培养物用RT-PCR(第9章)、荧光RT-PCR(第10章)或微量中和试验(第11章)做进一步鉴定和分析。

9 反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)

9.1 仪器设备

9.1.1 自动化核酸提取仪。

9.1.2 PCR仪。

9.1.3 台式低温高速离心机(离心速度12 000 r/min以上)。

9.1.4 稳压稳流电泳仪和水平电泳槽。

9.1.5 凝胶成像系统。

9.1.6 低温组织匀浆机。

9.1.7 微量可调移液器(0.5 μL ~2.5 μL 、1 μL ~20 μL 、20 μL ~200 μL 、100 μL ~1 000 μL)以及无RNase吸头。

9.2 试剂材料

9.2.1 商品化病毒RNA提取试剂盒。

9.2.2 商品化一步法RT-PCR核酸扩增试剂盒。

9.2.3 DEPC水,按照附录C中的C.1配制。

9.2.4 1 $\times$ TAE电泳缓冲液,按照C.2配制。

9.2.5 1%琼脂糖凝胶,按照C.3配制。

9.2.6 阳性对照品:CHIKV核酸阳性的全血。

9.2.7 阴性对照品:CHIKV核酸阴性的全血。

9.2.8 引物序列信息见附录D中的D.1,加DEPC水配制成100 $\mu\text{mol/L}$ 的储存浓度和20 $\mu\text{mol/L}$ 的工作浓度,−20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

9.3 样品处理

9.3.1 组织样品

取待检组织样品2.0 g于匀浆机中充分研磨,加10 mL的PBS混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 r/min离心15 min,取上清液转入无菌的1.5 mL离心管中,对样品进行编号。

9.3.2 血清、全血或血浆

直接使用。

9.3.3 细胞培养物

收获出现CPE的细胞培养物悬液,反复冻融3次,2 000 r/min离心20 min,取上清液转入无菌的1.5 mL离心管中,对样品进行编号。

9.4 试验方法

9.4.1 RNA的提取

用病毒RNA提取试剂盒提取各类样品中的病毒核酸,或用自动化核酸提取仪提取各类样品中的病毒核酸。核酸提取后,应立即检测或置于−80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。每次抽提核酸,应至少包括一个阳性对照和一个阴性对照。

9.4.2 RT-PCR扩增反应

9.4.2.1 反应体系配制

在每个PCR管内,配制25 μL 的RT-PCR扩增反应体系如下:

- 12.5 μL 的2 $\times$ 1 Step Buffer(Dye Plus);
- 1 μL 的PrimeScript 1 Step Enzyme Mix;
- 0.5 μL 的上游引物CHIKV_790F(20 $\mu\text{mol/L}$);
- 0.5 μL 的下游引物CHIKV_1207R(20 $\mu\text{mol/L}$);
- 2.5 μL 的RNA模板;
- 8 μL 的DEPC水。

每次进行RT-PCR扩增时均应设立阳性、阴性及空白对照。阳性对照应用阳性对照样品所提取的核酸作为模板,阴性对照应用阴性对照样品所提取的核酸作为模板,空白对照应用DEPC水作为模板。

9.4.2.2 RT-PCR反应条件

瞬时离心后,将PCR反应管放入PCR仪,按下列参数进行反应:50 $^{\circ}\text{C}$ 反转录30 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,52 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸35 s,35个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸7 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

9.4.2.3 琼脂糖凝胶电泳

将 1% 琼脂糖凝胶放入水平电泳槽,使电泳缓冲液刚好淹没胶面,取 6 μL RT-PCR 扩增产物,5 μL DL 2 000 DNA Marker 分别加入凝胶孔,按 5 V/cm 进行电泳 20 min~30min。电泳结束后,将琼脂糖凝胶置于凝胶成像系统中观察结果。

9.5 试验成立条件

阳性对照 RT-PCR 产物应有大小为 418 bp 的特异性扩增条带,且阴性对照和空白对照应无任何扩增条带。

9.6 结果判定

符合 9.5 的条件,被检样品有大小为 418 bp 的特异性扩增条带(见附录 D 中的图 D.1),且与阳性对照条带分子量大小相符,则该样品判为 CHIKV 核酸阳性;被检样品无特异性的扩增条带,则判为 CHIKV 核酸阴性。

10 荧光反转录-聚合酶链反应(荧光 RT-PCR)

10.1 仪器设备

10.1.1 荧光 PCR 仪(含 FAM 荧光通道)。

10.1.2 台式低温高速离心机(离心速度 12 000 r/min 以上)。

10.1.3 混匀器。

10.1.4 微量可调移液器(0.5 μL ~2.5 μL 、1 μL ~20 μL 、20 μL ~200 μL 、100 μL ~1 000 μL)以及无 RNase 吸头。

10.1.5 荧光 PCR 扩增管。

10.2 试剂材料

10.2.1 商品化病毒 RNA 提取试剂盒。

10.2.2 商品化一步法荧光 RT-PCR 核酸扩增试剂盒。

10.2.3 DEPC 水,按照 B.1 配制。

10.2.4 阳性对照品:同 9.2.6。

10.2.5 阴性对照品:同 9.2.7。

10.2.6 引物和探针序列信息见 D.3,加 DEPC 水配制成 100 $\mu\text{mol/L}$ 的储存浓度和 10 $\mu\text{mol/L}$ 的工作浓度,−20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

10.3 样品处理

同 9.3。

10.4 试验方法

10.4.1 RNA 的提取

同 9.4.1。

10.4.2 荧光 RT-PCR 扩增反应

10.4.2.1 反应体系配制

在每个荧光 PCR 管内,按下列方法配制 20 μL 的荧光 RT-PCR 扩增反应体系,根据仪器要求加入或不加入参比荧光 ROX:

- 10 μL 的 2×One Step RT-PCR Buffer;
- 0.4 μL 的 Ex Taq HS(5 U/ μL);
- 0.4 μL 的 PrimeScript RT Enzyme Mix II;
- 0.4 μL 的参比荧光 ROX I 或 II (或不加入参比荧光);
- 0.4 μL 的上游引物 CHK-TR-S(10 $\mu\text{mol/L}$);
- 0.4 μL 的下游引物 CHK-TR-A(10 $\mu\text{mol/L}$);
- 0.8 μL 的探针 CHK-FAM(10 $\mu\text{mol/L}$);

——2.5 μL 的 RNA 模板；

——4.7 μL 的 DEPC 水(不加入参比荧光的加入 5.1 μL 的 DEPC 水)。

每次进行荧光 RT-PCR 扩增时均应设立阳性对照、阴性对照及空白对照。阳性对照应用阳性对照样品所提取核酸作为模板,阴性对照应用阴性对照样品所提取核酸作为模板,空白对照应用 DEPC 水作为模板。

10.4.2.2 荧光 RT-PCR 反应条件

瞬时离心后,将 PCR 反应管放入荧光 PCR 仪,按下列参数进行反应:42 $^{\circ}\text{C}$ 反转录 10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s;60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 35 s,共 45 个循环,在每个循环的 60 $^{\circ}\text{C}$ 时收集 FAM 荧光信号。

10.4.2.3 荧光 RT-PCR 阈值线设定

一般根据荧光定量仪自动设置阈值线;若手动设置,阈值线应高于阴性对照和基线区。

10.5 试验成立条件

阳性对照的 C_t 值 ≤ 30 且出现特异性扩增曲线,阴性对照无 C_t 值或阴性对照 C_t 值 ≥ 40 且无特异性扩增曲线,试验结果有效;否则应重新进行试验。

10.6 结果判定

符合 10.5 的条件,被检样品 C_t 值 ≤ 38 且出现特异性扩增曲线,则判为 CHIKV 核酸阳性;当无 C_t 值或 C_t 值 ≥ 40 ,则判为 CHIKV 核酸阴性;当 $38 < C_t \leq 40$ 且出现特异性扩增曲线,则判为疑似。对疑似样品,模板量加倍(5 μL RNA 模板)进行 1 次复检,做 3 个重复;有 2 个重复 C_t 值 ≤ 40 且出现特异性扩增曲线即判为 CHIKV 核酸阳性,否则判为 CHIKV 核酸阴性。

11 微量中和试验

11.1 仪器设备

11.1.1 二氧化碳培养箱(37 $^{\circ}\text{C}$)。

11.1.2 冰箱(4 $^{\circ}\text{C}$ 、-20 $^{\circ}\text{C}$ 、-80 $^{\circ}\text{C}$)。

11.1.3 倒置生物显微镜。

11.1.4 微型振荡器。

11.1.5 微量可调移液器(0.5 μL ~2.5 μL 、1 μL ~20 μL 、20 μL ~200 μL 、100 μL ~1 000 μL),多道可调移液器(20 μL ~200 μL),配吸头。

11.1.6 96 孔平底细胞培养板。

11.2 试剂材料

11.2.1 阳性血清:CHIKV 阳性血清为确诊感染 CHIKV 的猪血清(中和抗体效价,筛检试验不低于 1:20,确认试验不低于 1:320),按照附录 E 中的 E.1 进行抗体效价测定。

11.2.2 阴性血清:商品化 SPF 猪血清。

11.2.3 细胞:BHK-21 细胞,使用浓度为 1.5×10^5 个细胞/mL。

11.2.4 细胞生长液及维持液:按照 A.4 配制。

11.2.5 0.1% 萘黑蓝染色液:按照 A.5 配制。

11.3 试验准备

11.3.1 病毒增殖

BHK-21 细胞应采用静止培养的方法培养。当细胞形成单层后,换为细胞维持液培养;接入待检病毒,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养,逐日观察,待 CPE 达到 75% 以上时收毒,分别置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 和 4 $^{\circ}\text{C}$ 冻融 3 次,置于无菌离心管中 2 000 r/min 离心 20 min,取上清液进行分装,-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

11.3.2 毒价测定

将待检病毒用细胞维持液作 10^{-1} ~ 10^{-6} 稀释;按每孔 50 μL ,将每个稀释度各 8 孔加进 96 孔平底细胞培养板,设细胞对照孔 8 孔,每孔各加入细胞维持液 50 μL ;上述各孔再补加细胞维持液 50 μL ,随后加

入细胞悬液 100 μL ;置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱内培养,连续观察 7 d,每天记录结果;当细胞无污染,且细胞对照孔中的细胞层完整的前提下,按照 D.2 计算细胞半数感染量 TCID_{50} 。

11.4 试验方法

11.4.1 试验设计及记录

按照 E.3 进行试验设计及记录。

11.4.2 操作步骤

11.4.2.1 阳性血清经 56 $^{\circ}\text{C}$ 处理 30 min 后,作 1 : 10 稀释。

11.4.2.2 将待检病毒用细胞维持液稀释为每 50 μL 含 100 个 TCID_{50} ,作为病毒工作液。

11.4.2.3 将 50 μL 阳性血清、50 μL 待检病毒液分别加入对应的孔(1~9 的样品检测区),振荡后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 中和 1 h,然后加入 100 μL 细胞悬液。

11.4.2.4 病毒对照、细胞对照和阴性对照设置为:

- a) 病毒对照:取病毒工作液,用细胞维持液稀释为 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 4 个稀释度; 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-3} 3 个稀释度,每个稀释度 4 孔, 10^{-2} 稀释度 8 孔,每孔 50 μL ;加 100 μL 细胞悬液,补细胞维持液 50 μL 达到总量 200 μL ;
- b) 细胞对照:设 4 孔,每孔加细胞悬液 100 μL ,补细胞维持液 100 μL 达到总量 200 μL ;
- c) 阴性对照:设 4 孔,每孔加入 1 : 10 稀释的阴性血清 50 μL ,病毒工作液 50 μL ,细胞悬液 100 μL 。

11.4.2.5 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养,连续观察 7 d,每天记录结果。

11.4.2.6 培养 7 d 后,每孔加入 0.1% 萘黑蓝染色液 50 μL ~100 μL ,室温静置 2 h~3 h,用水漂洗,晾干。

11.5 试验成立条件

11.5.1 细胞对照组不出现 CPE。

11.5.2 病毒对照,应保证在 100 个 TCID_{50} 的病毒液、 10^0 和 10^{-1} 稀释度的各孔均出现 CPE, 10^{-2} 有 2 个~6 个孔出现 CPE, 10^{-3} 孔无 CPE。

11.5.3 阴性对照应全部出现 CPE。

11.6 结果判定

11.6.1 符合 11.5 的条件,出现 CPE 记为 CPE+,不出现 CPE 为 CPE-。若某一组待测病毒未引起 CPE,则可初步认为是 CHIKV 阳性,再按 11.6.2 进一步确认。

11.6.2 将待测病毒作 10^{-1} ~ 10^{-8} 稀释,每个稀释度加 8 孔,每孔 50 μL ,其中前四孔每孔加 1 : 10 稀释的 CHIKV 阳性血清 50 μL ,后四孔每孔加 1 : 10 稀释的阴性血清 50 μL ,振荡混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 7 d,判定结果。当 CHIKV 阳性血清中和滴度较其阴性血清孔高出 2 个或 2 个以上,则可判定为该种病毒。

12 竞争酶联免疫吸附试验(C-ELISA)

12.1 仪器设备

12.1.1 96 孔平底聚苯乙烯酶标反应板。

12.1.2 微量可调移液器(1 μL ~20 μL 、20 μL ~200 μL 、100 μL ~1 000 μL),多道可调移液器(20 μL ~200 μL),配吸头。

12.1.3 酶标仪。

12.1.4 微孔板振荡器。

12.1.5 普通恒温箱(37 $^{\circ}\text{C}$)。

12.2 试剂材料

12.2.1 包被用抗原:CHIKV 重组的 C 和 E2 蛋白,按照附录 F 中的 F.1 制备和纯化。

12.2.2 CHIKV 竞争抗体:CHIKV 重组的 C 和 E2 蛋白免疫小鼠制备的高免血清,按照 F.2 制备和测定抗体效价。

12.2.3 阳性血清:同 11.2.1。

12.2.4 阴性血清:同 11.2.2。

12.2.5 酶结合物:辣根过氧化物酶标记的二抗(山羊抗鼠 IgG HRP 结合物)。

12.2.6 抗原包被液:0.05 mol/L(pH 9.6)碳酸盐缓冲液,按照附录 G 中的 G.1 配制。

12.2.7 洗涤缓冲液:PBST(pH 7.4),按照 G.2 配制。

12.2.8 封闭液及抗体稀释液:含 5%脱脂奶粉的 PBST(PBST-SM),按照 G.3 配制。

12.2.9 底物溶液:按照 G.4 配制,也可以使用商品化 TMB 溶液。

12.2.10 终止液:1 mol/L 硫酸,按照 G.5 配制。

12.3 样品处理

同 7.3.2。

12.4 试验方法

12.4.1 包被抗原

用包被液将抗原稀释到指定的工作浓度(4.12 μg/mL),每孔 100 μL 加入 96 孔酶标板中,4℃包被过夜。

12.4.2 封闭

用 PBST 洗板 3 次后,每孔加入 200 μL 的含 5%脱脂奶的 PBST(PBST-SM),37℃孵育 2 h 或 4℃孵育 16 h(过夜)。

12.4.3 加样

用 PBST 洗板 3 次后,将待检血清用稀释液作 1:10 稀释,每孔 50 μL 加入酶标板,每份样品加 2 孔;阳性血清和阴性血清分别用稀释液作 1:10 稀释,每个对照样品设 2 孔,每孔加 50 μL;空白对照 2 孔,每孔加 50 μL 稀释液。

12.4.4 反应

微孔板振荡器混合孔内的溶液,置于 37℃温箱内 30 min。

12.4.5 加入竞争抗体

用稀释液将 CHIKV 竞争抗体 1:500 倍稀释到指定的工作浓度,每孔 50 μL 加入酶标板,微孔板振荡器混合孔内的溶液,37℃温箱内放置 30 min。

12.4.6 加酶结合物

用 PBST 洗板 5 次,用稀释液将酶结合物 1:6 000 倍稀释到指定的工作浓度,每孔 100 μL 加入酶标板,微孔板振荡器混合孔内的溶液于 37℃温箱内放置 30 min。

12.4.7 洗板

用 PBST 洗板 5 次,在吸水纸上拍干。

12.4.8 加底物和终止液

每孔加 100 μL 底物溶液,室温避光反应 5 min~10 min,每孔加入 100 μL 终止液终止反应。

12.4.9 读数和抑制率计算

在酶标仪读取 450 nm 波长的光度吸收值(OD₄₅₀)。

以公式(1)计算抑制率(I)。

$$I = \left(\frac{OD_n - OD_s}{OD_n} \right) \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

式中:

OD_s —— 样品光度吸收值;

OD_n —— 标准阴性光度吸收值。

12.5 试验成立条件

阴性对照 OD_{450} 应在 0.8~1.5 范围内,阳性对照血清 OD_{450} 值 ≤ 0.30 ,试验条件成立。

12.6 结果判定

样品的抑制率大于 60% 判为 CHIKV 抗体阳性;小于 40% 判为阴性;介于 40%~60% 判为可疑,应重复,如仍为此结果,可判为阳性。

13 综合判定

13.1 经 6.5.1 判定为疑似猪基孔肯雅热病例,经 RT-PCR(第 9 章)、荧光 RT-PCR(第 10 章)任一项检测出 CHIKV 核酸阳性,或经病毒分离和微量中和试验(第 8 章和第 11 章)检测出 CHIKV 抗原阳性,可诊断为猪基孔肯雅热感染阳性。

13.2 无明显症状的猪经 RT-PCR(第 9 章)、荧光 RT-PCR(第 10 章)任一项检测出 CHIKV 核酸阳性,或经病毒分离和微量中和试验(第 8 章和第 11 章)检测出 CHIKV 抗原阳性,可诊断为 CHIKV 感染阳性。

13.3 无明显症状的动物若 RT-PCR(第 9 章)和荧光 RT-PCR(第 10 章)检测结果均为阴性,或病毒分离和微量中和试验(第 8 章和第 11 章)未检测出 CHIKV 抗原,应通过 C-ELISA 进行血清学检测。经 C-ELISA(第 12 章)检测出 CHIKV 抗体,可诊断为 CHIKV 抗体阳性。

附录 A

(规范性)

样品保存、病毒分离及微量中和试验相关溶液的配制

A.1 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4)

称取 8.0 g 氯化钠(NaCl)、0.2 g 氯化钾(KCl)、1.42 g 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、0.27 g 磷酸二氢钾(KH_2PO_4),将其溶于 950 mL 去离子水中,用 HCl 调节 pH 至 7.4 后,定容至 1 000 mL,103 kPa 高压蒸汽灭菌 20 min。保存于室温,PBS 一经使用,于 4 ℃ 保存不超过 3 周。

A.2 50% 甘油-PBS 保存液

0.01 mol/L PBS 与纯甘油(分析纯)等量混合,调整 pH 至 7.4,分装成小瓶,103 kPa 高压蒸汽灭菌 30min,室温或 4 ℃ 保存。

A.3 胰酶消化液

称取 8.0 g 氯化钠(NaCl)、0.4 g 氯化钾(KCl)、0.4 g 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、0.08 g 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、0.35 g 碳酸氢钠(NaHCO_3)、0.2 g 二水乙二胺四乙酸二钠($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、2.5 g 胰蛋白酶(Trypsin),加蒸馏水溶解至 1 000 mL,4 ℃ 静置 4 h,用 0.22 μm 孔径微孔滤膜滤过除菌,分装后-20 ℃ 保存。

A.4 细胞生长液和维持液

A.4.1 MEM 基础营养液

称取 9.5 g MEM 干粉、2.2 g 碳酸氢钠(NaHCO_3),加蒸馏水溶解至 1 000 mL,充分溶解后,经 0.22 μm 孔径微孔滤膜滤过除菌,4 ℃ 保存。

A.4.2 200 mmol/L 谷氨酰氨溶液(母液)

称取 2.923 g 谷氨酰氨(L-glutamin),加入双蒸馏水(dd H_2O)100 mL,充分溶解后,经 0.22 μm 孔径微孔滤膜滤过除菌,4 ℃ 保存。

A.4.3 细胞生长液

取 900 mL 的 MEM 基础培养液,加入 100 mL 的灭活胎牛血清,配制成 1 000 mL 的溶液(含青霉素 100 U/mL、链霉素 100 $\mu\text{g/mL}$ 、两性霉素 B 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 、谷氨酰氨 2 mmol/L,pH 7.2),4 ℃ 保存。

A.4.4 细胞维持液

取 980 mL 的 MEM 基础培养液,加入 20 mL 的灭活胎牛血清,配制成 1 000 mL 的溶液(含青霉素 100 U/mL、链霉素 100 $\mu\text{g/mL}$ 、两性霉素 B 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 、谷氨酰氨 2 mmol/L,pH 7.2),4 ℃ 保存。

A.5 0.1% 萘黑蓝染色液配制

称取 1.0 g 萘黑(naphthalene black)、13.6 g 无水乙酸钠($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$),加入 60.0 mL 乙酸(CH_3COOH),加蒸馏水定溶至 100mL,充分溶解后,室温保存。

附 录 B
(资料性)
CHIKV 分离物 CPE

CHIKV 分离物接种 BHK-21 细胞后 32 h 的 CPE 如图 B.1 所示。

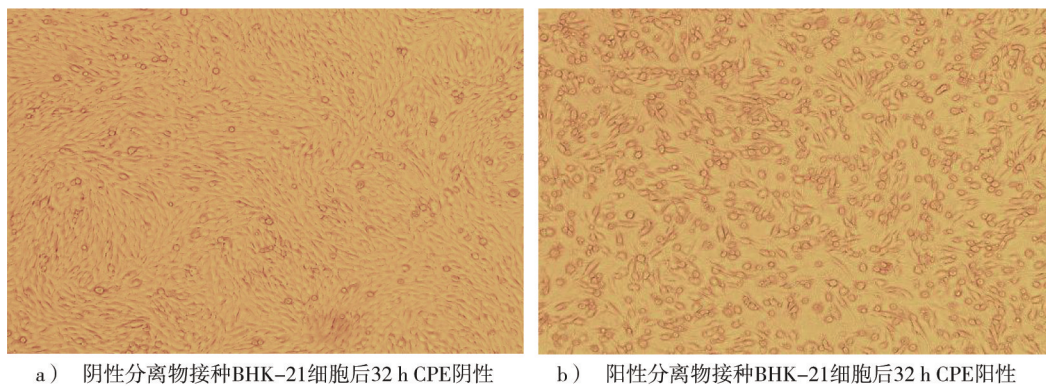


图 B.1 CHIKV 分离物接种 BHK-21 细胞的 CPE

附 录 C

(规范性)

反转录-聚合酶链反应溶液的配制

C.1 DEPC 水的配制

取 1 mL 的 DEPC(Diethyl pyrocarbonate),加去离子水溶解至 1 000 mL,充分混匀,将瓶盖拧松后置于 37 ℃ 过夜,103 kPa 高压蒸汽灭菌 20 min。

C.2 1×TAE 电泳缓冲液

称取 242.0 g 三羟甲基氨基甲烷(Tris)、37.2 g 二水乙二胺四乙酸二钠($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、57.1 mL 乙酸(CH_3COOH),加去离子水溶解至 1 000 mL,充分溶解后配制成 50×TAE 电泳缓冲液,室温保存。

取 20 mL 的 50×TAE,加去离子水溶解至 1 000 mL,充分混匀配制成 1×TAE 电泳缓冲液,室温保存。

C.3 1%琼脂糖凝胶

称取 1 g 琼脂糖粉末,加入 100 mL 的 1×TAE 电泳缓冲液,微波炉中溶解后,冷却至 60 ℃,加入溴化乙锭储液使其最终浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,并充分混匀,倒入胶槽内自然凝固。

附 录 D
(资料性)

反转录-聚合酶链反应引物和探针序列及电泳结果

D.1 RT-PCR 引物序列

CHIKV RT-PCR 的引物序列位于 CHIKV 亚洲谱系毒株 RNA 中编码非结构蛋白的高度保守区域
参见 D.2,引物的序列为:

上游引物 CHIKV_790F:5'-TGTGCTGTTCTCAGTAGGGT-3';

下游引物 CHIKV_1207R:5'-GTTTCGTATTCCGTTGCGT-3'。

D.2 RT-PCR 引物位置及特异性扩增片段序列(418 bp)

781 AGAGGGAAGA AGCTAAAACC GTGTGACCGT GTGCTGTTCT CAGTAGGGTC AACGCTCTAC
841 CCGGAAAGCC GCAAGCTACT TAAGAGCTGG CACTTACCAT CGGTGTTCCA TCTAAAGGGC
901 AAATCAGCT TCACATGCCG CTGTGATACA GTGGTTTCGT GCGAGGGCTA CGTCGTAAAG
961 AGAATAACGA TGAGCCCAGG CCTTTATGGA AAAACCACAG GGTATGCGGT AACCCACCAC
1 021 GCAGACGGAT TCTTGGTGTG CAAGACTACC GACACGGTTG ACGGCGAAAG AGTGTCATTC
1 081 TCGGTGTGCA CACATGTCG GCGACCAT TGTGATCAAA TGACCGGCAT CCTTGCTACA
1 141 GAAGTCACGC CGGAGGATGC ACAGAAGCTG TTGGTGCGGC TGAACCAGAG AATAGTGGTT
1 201 AACGGCAGAA CGCAACGGAA TACGAACACC ATGAAAAACT ATCTGCTTCC CGTGGTCGCC

D.3 荧光 RT-PCR 引物和探针序列

引物与探针序列根据 GenBank 亚洲谱系毒株 RNA 中编码非结构蛋白的保守区域序列(参见 D.4)设计,引物和探针的序列为:

上游引物 CHK-TR-S:5'-CGGCGACCATTTGTGATCA-3';

下游引物 CHK-TR-A:5'-TCGTATTCCGTTGCGTTCTG-3';

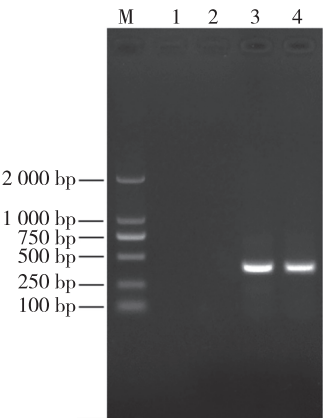
探针序列 CHK-FAM:5'-(FAM) TCCTTGCTACAGAAGTCACGCCGGA (BHQ1)-3'。

D.4 荧光 RT-PCR 引物和探针位置及特异性扩增片段序列(127 bp)

1 081 TCGGTGTGCA CACATGTCG GCGACCAT TGTGATCAAA TGACCGGCAT CCTTGCTACA
1 141 GAAGTCACGC CGGAGGATGC ACAGAAGCTG TTGGTGCGGC TGAACCAGAG AATAGTGGTT
1 201 AACGGCAGAA CGCAACGGAA TACGAACACC ATGAAAAACT ATCTGCTTCC CGTGGTCGCC

D.5 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果见图 D.1。



标引序号说明：
M——Marker(Marker 为核酸分子量标准 DL 2 000)；
1——空白对照；
2——阴性对照；
3——阳性对照；
4——CHIKV 核酸阳性样品。

图 D. 1 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

附 录 E
(规范性)

微量中和试验抗体效价和毒价测定及血清对照排列表

E. 1 抗体效价测定

E. 1. 1 试验方法

采用血清中和试验进行抗体效价测定,具体步骤如下:

- a) 待测血清经 56 ℃处理 30 min 后,用细胞维持液作 1:(10~1 280)倍比稀释;
- b) 按照 E. 2 进行毒价测定,将测定毒价的 CHIKV 病毒液用细胞维持液分别稀释成 100 个、10 个和 1 个 TCID₅₀ 3 个浓度;
- c) 将稀释好的待测血清每孔 50 μL 加入到 96 孔细胞培养板,每个稀释度加 8 孔;
- d) 在上述孔中,每孔 50 μL 加入 100 个 TCID₅₀ 的病毒液,充分振荡混匀后,37 ℃孵育 60 min;每孔 100 μL 加入细胞浓度为 1.5×10⁵个细胞/mL 的 BHK-21 细胞悬液;
- e) 病毒对照:100 个和 10 个 TCID₅₀ 的各 4 孔、1 个 TCID₅₀ 的 8 孔,每孔 50 μL;每孔加 100 μL 细胞悬液,并补细胞维持液 50 μL 达到总量 200 μL;
- f) 细胞对照:设 4 孔~6 孔,每孔加细胞悬液 100 μL,补细胞维持液 100 μL 达到总量 200 μL;
- g) 充分振荡混匀后,置于 37 ℃、5% CO₂培养箱中培养 7 d,判定结果。

E. 1. 2 试验成立条件

细胞对照组不出现 CPE;病毒对照,应保证在 100 个和 10 个 TCID₅₀ 的各孔均出现 CPE,1 个 TCID₅₀ 的对照孔内应有 2 个~6 个孔出现 CPE。

E. 1. 3 结果计算

符合 E. 1. 2 的条件,出现 CPE 记为 CPE+,不出现 CPE 为 CPE-。
根据公式(E. 1)计算抗体效价。

$$PD_{50} = 1 : 10^{[\lg A + (0.5 \times \frac{B}{C}) \times \lg 2]} \dots\dots\dots (E. 1)$$

式中:

- PD₅₀——中和抗体效价;
- A ——显示完全中和(不出现 CPE)的最大血清稀释度(1:A);
- B ——完全中和的最大血清稀释度以下,还有多少孔出现了中和保护;
- C ——每个稀释度重复孔数。

E. 1. 4 测定示例

见表 E. 1。

表 E. 1 测定示例数据

血清稀释度	重复								病毒对照		细胞对照
	1 号	2 号	3 号	4 号	5 号	6 号	7 号	8 号			
1:10	—	—	—	—	—	—	—	—	100	1	—
1:20	—	—	—	—	—	—	—	—	100	1	—
1:40	—	—	—	—	—	—	—	—	100	1	—
1:80	—	—	—	—	—	—	—	—	100	1	—
1:160	—	+	—	+	—	+	—	+	10	1	—
1:320	+	+	+	+	+	+	+	+	10	1	—
1:640	+	+	+	+	+	+	+	+	10	1	—

表 E. 1 (续)

血清稀释度	重复								病毒对照		细胞对照
	1 号	2 号	3 号	4 号	5 号	6 号	7 号	8 号			
1 : 1 280	+	+	+	+	+	+	+	+	10	1	—

说明：

表 E. 1 中粗黑框表示细胞培养板内各孔的布位，出现 CPE 记为 CPE+，不出现 CPE 为 CPE-。1 号~8 号为样品检测区，同一稀释度的 8 个重复。病毒对照：100、10、1 分别表示 100 个、10 个和 1 个 TCID₅₀ 的 3 个稀释度，100 个和 10 个 TCID₅₀ 各加 4 孔，1 个 TCID₅₀ 加 8 个孔。细胞对照加 8 孔。

表中显示完全中和的最大血清稀释度为 1 : 80，A 即为 80；完全中和的最大血清稀释度（1 : 80 的血清稀释度）以下，还有 4 个孔出现了中和保护，B 即为 4；每个稀释度做了 8 个孔的重复，C 即为 8。

依据公式(E. 1)计算抗体效价 PD₅₀：

$$\begin{aligned} PD_{50} &= 1 : 10^{[\lg A + (0.5 \times \frac{A}{C}) \times \lg 2]} \\ &= 1 : 10^{[\lg 80 + (0.5 \times \frac{1}{8}) \times \lg 2]} \\ &= 1 : 160 \end{aligned}$$

即该份血清中和抗体效价为 1 : 160。

E. 2 Karber 方法毒价测定

Karber 法的公式见式(E. 2)，用常用对数(lg)计算。

$$\lg \text{TCID}_{50} (\text{或 } LD_{50}、EID_{50}) = L + d(s - 0.5) \quad \text{..... (E. 2)}$$

式中：

TCID₅₀——半数组织细胞感染量；

L——病毒的最低稀释度的对数(lg)；

d——稀释系数，即组距；

s——CPE 比值的和。

以下例(见表 E. 2)说明。

表 E. 2 病毒 TCID₅₀ 滴定

病毒稀释度	病毒稀释度对数(lg)	CPE 比值
10 ⁻²	-2	4/4
10 ⁻³	-3	4/4
10 ⁻⁴	-4	4/4
10 ⁻⁵	-5	3/4
10 ⁻⁶	-6	1/4
10 ⁻⁷	-7	0/4

本例中 L = -2，d = -1，s = 4/4 + 4/4 + 4/4 + 3/4 + 1/4 + 0/4 = 4.0

代入公式：lgTCID₅₀ = -2 + (-1) × (4.0 - 0.5)

 = -5.5

TCID₅₀ = 10^{-5.5}

查反对数表可得 TCID₅₀ = 1/316 228，即每 50 μL 含 316 228 个 TCID₅₀。如各稀释度均为 0.1 mL，那么 1 mL 中含 6 324 560 个 TCID₅₀ 或 10^{6.8} 个 TCID₅₀。

病毒毒价通常以每毫升含多少 TCID₅₀ (或 LD₅₀、ELD₅₀) 表示，本例病毒毒价为每毫升含 6 324 560 个 TCID₅₀。

E. 3 血清和对照排列表

见表 E. 3。

表 E.3 血清和对照排列表

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1			1			1			$V10^{-3}$	S	$V10^{-2}$
B	2			2			2			$V10^{-3}$	S	$V10^{-2}$
C	4			4			4			$V10^{-3}$	S	$V10^{-2}$
D	5			5			5			$V10^{-3}$	S	$V10^{-2}$
E	6			6			6			$V10^0$	$V10^{-1}$	$V10^{-2}$
F	7			7			7			$V10^0$	$V10^{-1}$	$V10^{-2}$
G	8			8			8			$V10^0$	$V10^{-1}$	$V10^{-2}$
H	C. C	C. C	C. C	C. C	C. C	C. C	C. C	C. C	C. C	$V10^0$	$V10^{-1}$	$V10^{-2}$

说明：

表中粗黑框表示细胞培养板内各孔的布位。1～9 为样品检测区，其中 1～3 为样品 1 检测区，4～6 为样品 2 检测区，7～9 为样品 3 检测区；10～12 为对照区。

V 表示病毒对照， $V10^0$ 、 $V10^{-1}$ 、 $V10^{-2}$ 、 $V10^{-3}$ 四个稀释度， $V10^{-2}$ 为 1 个 TCID₅₀，加 8 个孔，其余每个稀释度占用 4 孔。

C. C 表示细胞对照。

S 表示阴性血清对照。

附录 F

(规范性)

基孔肯雅病毒 C 和 E2 重组蛋白及高免血清的制备

F.1 基孔肯雅病毒 C 和 E2 重组蛋白的制备

F.1.1 重组杆粒

F.1.1.1 重组转移载体 pFBD-C-E2 的构建

将 CHIKV 的衣壳蛋白 C 和包膜糖蛋白 E2 克隆到 pFBD 载体,具体步骤如下:

- 对 CHIKV 的 C 和 E2 基因进行 PCR 扩增和纯化;
- 胶回收纯化后的 C 基因与载体分别用 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切;
- 将 C 目的片段连接到酶切纯化过的 pFBD 载体中,转化 DH5 α 感受态细胞并进行菌落 PCR 鉴定;
- 将阳性菌落进行扩大培养,并提取质粒;
- 对提取的质粒用 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切鉴定,并将测序正确的命名为 pFBD-C;
- 将纯化后的 E2 基因与重组质粒 pFBD-C 分别用 *Nhe* I 和 *Kpn* I 进行双酶切,对切下有特异性条带的凝胶进行胶回收;
- 回收产物测定浓度后进行连接、转化,然后通过菌落 PCR 鉴定,将鉴定阳性的菌扩大培养提取质粒,再通过 *Nhe* I 和 *Kpn* I 对质粒进行双酶切鉴定分析,正确地命名为 pFBD-C-E2。

F.1.1.2 重组杆粒 rBacmid-C-E2 的构建

将构建好的 pFBD-C-E2 转化至 *E. coli* DH10Bac 感受态细胞并进行 PCR 鉴定,具体步骤如下:

- 将 *E. coli* DH10Bac 感受态细胞在冰上融化后,加入 2 μ L pFBD-C-E2 质粒,冰上放置 30 min;
- 将混合液放在事先调为 42 $^{\circ}$ C 的金属浴中热激 90 s,然后再迅速冰浴 3 min;
- 在超净台内往混合液中加入 800 μ L 预热的含卡那霉素和四环素抗性的 LB 液体培养基,在 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 的摇床上培养 1 h;
- 4 500 r/min 室温离心 2 min,在超净台中弃掉 700 μ L 部分上清液,余约 200 μ L 液体悬起沉淀,加至含有 X-Gal 和 IPTG 的卡那霉素(50 μ g/mL)的 LB 平板上,用涂菌棒涂抹均匀,置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 12 h~16 h,至平板上长出菌落;
- 蓝白斑筛选,挑取白色的单个菌落,接种于 5 mL 含三抗的 LB 液体培养基中,在 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 的摇床上培养 12 h 左右;
- 将重组的杆状病毒质粒进行扩大培养,提取质粒后进行 PCR 鉴定。

F.1.2 重组杆状病毒的表达

F.1.2.1 P1 代毒株的获取

将重组杆粒 rBacmid-C-E2 转染至 sf9 昆虫细胞,具体步骤如下:

- 稀释活率大于 90% 的 sf9 细胞到 5.5×10^5 /mL,接种到 6 孔板中,每孔加 2 mL 使得每孔的细胞总数为 1.1×10^6 个,放在 27 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 1 h 使细胞贴壁;
- 分别取出 1 μ g 纯化的杆粒 DNA 和 6 μ L 翻转混合过的 Cellfectin 试剂稀释到 100 μ L 未补充 Grace 培养基中,然后将二者混合后在室温孵育 30 min;
- 向混合液中加入 800 μ L 培养基,混匀后加到提前弃掉细胞培养基的六孔板中,放在 27 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 5 h;
- 弃去六孔板中的混合液,加 2 mL 全培养基,放在 27 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 72 h;
- 72 h 后,细胞出现明显病变,收集培养液,离心除去细胞碎片,所获得上清液即为 P1 代毒株,存于 -80 $^{\circ}$ C 备用。

F.1.2.2 P1 代毒株的扩增

由于 P1 代毒株的病毒滴度比较低,所以要用 P1 代毒株继续感染 sf9 细胞,以获得滴度较高的病毒毒株。向铺满 sf9 细胞的细胞瓶中按 1:10 比例加 P1 代病毒液,放在 27℃ 培养箱中培养 72 h,待细胞出现明显病变,收集培养液,离心除去细胞碎片,所获得上清即为 P2 代毒株,存于-80℃ 备用。同样,用 P2 代病毒液感染 sf9 细胞获得 P3 代毒株,并对 P3 代进行鉴定。

F.1.3 重组蛋白的纯化

具体步骤如下:

- 将 P3 代的病毒液接种 sf9 细胞进行扩大培养,在无血清条件下 27℃ 摇床上孵育 72 h;
- 2 000 r/min 离心 15 min,将细胞从培养基中分离出来;
- 在上清培养基中加入 7%(W/V)聚乙二醇(PEG)-6000 和 0.5 mol/L NaCl,充分溶解后,在室温条件下静置 2 h 沉淀分泌的蛋白;
- 将沉淀重悬于 1 mL GTNE 缓冲液(200 nmol/L 甘氨酸、50 mmol/L Tris-HCl、100 mmol/L NaCl、1 mmol/L EDTA, pH 7.3)中,并进行 70%(W/V)、40%(W/W)的不连续蔗糖梯离心(25 000 r/min 离心 2 h, 4℃);
- 用 5 mL GTNE 缓冲液重悬 70%~40%间的蛋白条带,4℃ 下 28 000 r/min 离心 30 min 沉淀蛋白;
- 将沉淀重悬于 50 μL GTNE 中,并在-80℃ 保存。

F.1.4 重组蛋白检测

F.1.4.1 SDS-PAGE

取重组蛋白样品,加入 2×蛋白上样缓冲液混匀,水浴煮沸 5 min 上样。用 80 V 电压电泳至溴酚蓝到分离胶,把电压提高到 120 V,继续电泳至溴酚蓝到达凝胶底部。取下凝胶,用考马斯亮蓝染色 2 h 后脱色。待蓝色背景脱净后,观察和分析电泳结果。

F.1.4.2 纯化蛋白浓度测定

用紫外分光光度法测定 C 和 E2 重组蛋白浓度,根据公式(F.1)计算蛋白浓度。

$$M = (1.45 \times OD_{280} - 0.74 \times OD_{260}) \times N \dots\dots\dots (F.1)$$

式中:

M ——蛋白浓度,单位为毫克每毫升(mg/mL);

N ——稀释倍数。

以 $OD_{280}/OD_{260} > 1.6$ 为蛋白纯度合格。

F.2 高免血清的制备

F.2.1 动物免疫

采用 F.1 制备的重组蛋白通过常规方法免疫昆明小鼠获取高免血清。一共免疫 4 次,免疫间隔 21 d。首次免疫取 0.01 mol/LPBS 稀释的抗原与等体积弗氏完全佐剂混合,充分乳化后,经背部、皮下、腋窝、腹股沟多点注射,2.5 μg/只,共免疫 5 只;第 2 次、第 3 次免疫将抗原与等体积弗氏不完全佐剂混合,充分乳化后,经背部、皮下及足跖部,注射抗原量倍增;第 4 次经尾静脉注射进行加强免疫。

F.2.2 抗体效价测定

采用间接 ELISA 方法,进行抗体效价测定,具体步骤如下:

- 用包被液将 CHIKV 的重组 C 和 E2 蛋白稀释至工作浓度(4.12 μg/mL),分别包被 96 孔酶标板(防止产生气泡),每孔 100 μL,37℃ 孵育 2 h 后置于 4℃ 过夜;
- 以 PBST 洗涤 3 次,在纸巾上拍干,每孔加入 120 μL 封闭液(G.3),37℃ 封闭 2 h,沥干;
- 加入 1:(40~20 480)倍比稀释的免疫小鼠血清,并以正常小鼠的血清作阴性对照,37℃ 孵育 30 min, PBST 洗涤 4 次;
- 加入羊抗鼠 IgG-HRP,37℃ 孵育 30 min, PBST 洗涤 5 次;
- 以 TMB 显色液避光显色 10 min, 1 mol/L 硫酸(G.5)终止反应;

- f) 酶标检测仪测定 OD_{450} 值,效价达到 1 : 1 280 为免疫合格,采集血液分离血清,小瓶分装,置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

附 录 G

(规范性)

竞争酶联免疫吸附试验用溶液的配制

G.1 包被液——0.05 mol/L(pH 9.6)碳酸盐缓冲液

称取 0.318 g 碳酸钠(Na_2CO_3)、0.588 g 碳酸氢钠(NaHCO_3),加去离子水溶解至 200 mL,充分溶解后用 0.22 μm 膜过滤除菌,室温保存备用。

G.2 洗涤缓冲液——pH 7.4 的 PBST(含 0.05%吐温-20)

取 0.5 mL 吐温-20(Tween-20),加入 1 000 mL 的 PBS(pH 7.4)充分混匀后,室温保存,宜现用现配。

G.3 封闭液及抗体稀释液——含 5%脱脂奶粉的 PBS(pH 7.4)

称取 5.0 g 脱脂奶粉,加入 100 mL 的 PBS(pH 7.4),充分溶解后,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,宜现用现配。

G.4 底物溶液

G.4.1 底物 A 液

称取 5.0 g 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)、0.06 g 过氧化氢尿素 $[\text{CO}(\text{NH}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}_2]$ 、100 mL 柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$),加入 100 mL 去离子水,充分溶解后,避光 4 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 保存,宜现用现配。

G.4.2 底物 B 液

称取 1.05 g 柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)、14.6 mg 乙二胺四乙酸(EDTA)、25.0 mg 的 3,3'-二氨基联苯胺(DAB),加入 100 mL 去离子水,充分溶解后,用 0.45 μm 滤膜过滤,避光 4 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 保存,现用现配。

G.4.3 用法

使用时,将 A 液、B 液按 1:1 的比例混合,现用现配。

G.5 终止液——1 mol/L H_2SO_4

取 5.5 mL 浓硫酸(H_2SO_4),缓缓加入 94.5 mL 的蒸馏水中,边加边搅拌,充分混匀后室温保存。
