

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1187—2006

鸡传染性贫血病毒聚合酶链反应试验方法

Polymerase chain reaction for chicken infectious anemia virus

2006-07-10 发布

2006-10-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

鸡传染性贫血(Chicken Infectious Anemia)是由鸡传染性贫血病毒(Chicken Infectious Anemia Virus)引起的一种传染病,主要损害鸡的造血和淋巴器官,引起雏鸡再生障碍性贫血和全身淋巴组织萎缩,导致免疫功能抑制,已成为危害养鸡业的重要疫病之一。

本标准附录 A 为规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会归口。

本标准主要起草人:田克恭、王宏伟、孙明、王传彬、陈西钊。

鸡传染性贫血病毒聚合酶链反应试验方法

1 范围

本标准规定了鸡传染性贫血病毒(CAV)聚合酶链反应(PCR)的技术要求。

本标准适用于鸡血清和组织中的鸡传染性贫血病毒检测。

2 试剂

2.1 消化液(见附录 A.1)

2.2 2%蛋白酶 K 溶液

2.3 酚/氯仿/异戊醇混合液(见附录 A.2)

2.4 2.5 mmol/LdNTP

2.5 8 mmol/L 上下游引物混合液(引物序列见附录 A.3)

2.6 0.5 U/ μ L TaqDNA 聚合酶

2.7 10 \times PCR 缓冲液

2.8 1%溴化乙锭(EB)溶液

2.9 TAE 电泳缓冲液

2.10 1%琼脂糖凝胶

2.11 上样缓冲液(见附录 A.4)

2.12 其他试剂:异丙醇(分析纯)、100 bp Marker、75%乙醇溶液、15 mmol/L 氯化镁溶液、灭菌双蒸水。

3 实验室条件

3.1 实验室必须为生物安全 II 级(BSL-2 级)以上实验室。

3.2 实验室分区:PCR 试验区域分 PCR 反应液配制区—配液区、模板提取区、扩增区、电泳区;流程顺序为配液区→模板提取区→扩增区→电泳区。严禁器材和试剂倒流。

3.3 实验室应配备的仪器及耗材

3.3.1 仪器:分析天平、高速离心机、真空干燥器、PCR 扩增仪、电泳仪、电泳槽、紫外凝胶成像仪(或紫外分析仪)、液氮罐或 -70 $^{\circ}$ C 冰箱、微波炉、组织研磨器、-20 $^{\circ}$ C 冰箱、水浴锅、可调移液器(最大量程为 2 μ L、20 μ L、200 μ L、1 000 μ L)。

3.3.2 耗材:眼科剪、眼科镊、称量纸、10 mL 一次性注射器、1.5 mL 灭菌离心管、0.2 mL 薄壁 PCR 管、琼脂糖、500 mL 量筒、500 mL 锥形瓶、吸头(10 μ L、200 μ L、1 000 μ L)、灭菌双蒸水。

4 操作程序

4.1 样品的采集与处理

4.1.1 样品的采集:濒死鸡、扑杀鸡取肝脏;待检活鸡,用注射器取血 2 mL~4 mL,立即送往实验室。

4.1.2 样品的处理:每份样品分别处理。

4.1.2.1 组织样品处理:取待检病料约 0.2 g 置研磨器中剪碎并研磨,加入 2 mL 消化液继续研磨。取已研磨好的待检病料上清 200 μ L,置 1.5 mL 灭菌离心管中,再加入 400 μ L 消化液和 10 μ L 蛋白酶 K 溶

液,混匀后,置 55℃ 水浴中 4 h~16 h。

4.1.2.2 血清样品处理:待血液凝固后取血清放于离心管中,4℃ 8 000 g 离心 5 min,取上清 200 μ L,置 1.5 mL 灭菌离心管中,加入 400 μ L 消化液和 10 μ L 蛋白酶 K 溶液,混匀后,置 55℃ 水浴中 4 h~16 h。

4.1.2.3 阳性对照处理:取鸡传染性贫血病毒细胞培养液 200 μ L,置 1.5 mL 灭菌离心管中,加入 400 μ L 消化液和 10 μ L 蛋白酶 K 溶液,混匀后,置 55℃ 水浴中 4 h~16 h。

4.1.2.4 阴性对照处理:取 SPF 鸡血清 200 μ L,置 1.5 mL 灭菌离心管中,加入 400 μ L 消化液 10 μ L 蛋白酶 K 溶液,混匀后,置 55℃ 水浴中 4 h~16 h。

4.2 DNA 模板的提取

4.2.1 取出已处理的待检样品及阴性、阳性对照,每管加入 600 μ L 酚/氯仿/异戊醇混合液,用力颠倒 10 次混匀,13 000 g 离心 10 min。

4.2.2 取上清置 1.5 mL 灭菌离心管中,加入等体积异丙醇,混匀,置液氮中 3 min 或 -70℃ 冰箱中 30 min。取出样品管,室温融化,-4℃ 20 000 g 离心 15 min。

4.2.3 弃上清,沿离心管开口方向管壁缓缓滴入 -20℃ 预冷的 75% 乙醇液 1 mL,轻轻旋转洗一次后倒掉,将离心管倒扣干吸水纸上 1 min,真空抽干 15 min。

4.2.4 取出样品管,用 50 μ L 灭菌双蒸水溶解沉淀,作为模板备用。

4.3 PCR 扩增:每管取灭菌双蒸水 8 μ L、2.5 mmol/L dNTP、8 mmol/L CAV 引物、15 mmol/L 氯化镁、10 \times PCR 缓冲液、0.5 U/ μ L Taq DNA 聚合酶各 2 μ L,DNA 模板 2 μ L。混匀,作好标记,加入矿物油 20 μ L,覆盖(有热盖的自动 DNA 热循环仪不用加矿物油)。扩增条件为 94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 30 s,35 个循环后,72℃ 延伸 7 min。

4.4 电泳

将 PCR 扩增产物 15 μ L 与 3 μ L 上样缓冲液混合,加样于 1% 琼脂糖凝胶孔中,琼脂糖凝胶板一侧点样孔加入 100 bp Ladder Marker(分子量标准物),以 5 V/cm 电压电泳 40 min,用紫外凝胶成像仪观察结果。

5 结果判定

当阳性对照出现 675 bp 扩增带,阴性对照未出现目的带时,实验结果成立。被检样品出现 675 bp 扩增带为 CAV 阳性,未出现相应扩增带的样品判为阴性。

附录 A
(规范性附录)
试剂的配制

A.1 消化液的配制**A.1.1 1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCL)(pH 8.0)**

三羟甲基氨基甲烷	12.11 g
灭菌双蒸水	80 mL
浓盐酸	调 pH 至 8.0
灭菌双蒸水	加至 100 mL

A.1.2 0.5 mol/L 乙二铵四乙酸二钠(EDTA)溶液(pH 8.0)

二水乙二铵四乙酸二钠	18.61g
灭菌双蒸水	80 mL
氢氧化钠	调 pH 至 8.0
灭菌双蒸水	加至 100 mL

A.1.3 20%十二烷基硫酸钠溶液(pH 7.2)

十二烷基硫酸钠	20 g
灭菌双蒸水	80 mL
浓盐酸	调 pH 至 7.2
灭菌双蒸水	加至 100 mL

A.1.4 消化液

1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCL)(pH 8.0)	2 mL
0.5 mol/L 乙二铵四乙酸二钠溶液(pH 8.0)	0.4 mL
20% 十二烷基硫酸钠溶液(pH 7.2)	5 mL
5 mol/L 氯化钠	4 mL
灭菌双蒸水	加至 200 mL

A.2 酚/氯仿/异戊醇混合液

碱性酚	25 mL
氯仿	24 mL
异戊醇	1 mL

A.3 引物序列

上游引物 P₁ 5' GAC TGT AAG ATG GCA AGA CGA GCT C 3'
下游引物 P₂ 5' GGC TGA AGG ATC CCT CAT TC 3'

A.4 上样缓冲液

溴酚蓝 0.2 g, 加双蒸水 10 mL 过夜溶解。50 g 蔗糖加入 50 mL 水溶解后, 移入已溶解的溴酚蓝溶

NY/T 1187—2006

液中,摇匀定容至 100 mL。
