

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 548—2015
代替 NY/T 548—2002

猪传染性胃肠炎诊断技术

Diagnostic techniques for transmissible gastroenteritis

2015-05-21 发布

2015-08-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 NY/T 548—2002《猪传染性胃肠炎诊断技术》。

本标准与 NY/T 548—2002 相比,病原检测部分增加了 RT-PCR 检测方法。

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(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

本标准主要起草人:冯力、陈建飞、时洪艳、张鑫

本标准的历次版本发布情况为:

——NY/T 548—2002。

猪传染性胃肠炎诊断技术

1 范围

本标准规定了猪传染性胃肠炎的病原学检测和血清学检测。病原学检测包括病毒分离鉴定、直接免疫荧光法、双抗体夹心酶联免疫吸附试验和反转录—聚合酶链式反应。血清学检测包括血清中和试验和间接酶联免疫吸附试验。

本标准适用于对猪传染性胃肠炎的诊断、产地检疫及流行病学调查等。

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 分析实验室用水规格和实验方法

GB 19489 实验室生物安全通用要求

GB/T 27401 实验室质量控制规范 动物检疫

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

猪传染性胃肠炎 *transmissible gastroenteritis, TGE*

猪传染性胃肠炎是由尼多目(*Nidovirales*)、冠状病毒科(*Coronaviridae*)、 α -冠状病毒属的猪传染性胃肠炎病毒(*transmissible gastroenteritis virus, TGEV*)引起的猪的一种急性、高度接触传染性的肠道疾病,以呕吐、水样腹泻、脱水和 10 日龄以内仔猪的高死亡率为主要特征。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CPE: cytopathic effect 细胞病变作用。

DIA: direct Immunofluorescence assay 直接免疫荧光法。

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

PBS: phosphate buffered saline 磷酸盐缓冲液。

PRCV: porcine respiratory coronavirus 猪呼吸道冠状病毒。

TGE: transmissible gastroenteritis 猪传染性胃肠炎。

RT - PCR: reverse transcription - polymerase chain reaction 反转录—聚合酶链式反应。

5 临床诊断

5.1 流行特点

TGE 的发生和流行有暴发流行、地方流行和周期性地方流行 3 种形式。若感染了 TGEV 的变异株 PRCV,则会出现不同的流行模式,从而使 TGEV 的流行更加复杂化。本病一年四季均可发生,一般多发生在冬季和春季,有时也发生于夏季、秋季。各种年龄的猪均可感染,尤其是 10 日龄以内的哺乳仔猪,发病率和死亡率可高达 100%。病猪、带毒猪和隐性感染猪是本病的主要传染源。病毒通过粪一口

途径、气溶胶或感染母猪的乳汁进行传播。

5.2 临床症状

本病的潜伏期较短,通常为 18 h 至 3 d。感染发生后,传播迅速,2 d~3 d 可波及整个猪群。临床表现因猪龄大小而异,新生仔猪的典型症状是呕吐、水样腹泻、脱水、体重迅速下降,导致新生仔猪高发病率和死亡率高。腹泻严重的仔猪,常出现未消化的乳凝块。粪便腥臭,病程短,症状出现后 2 d~7 d 死亡。泌乳母猪发病,则一过性体温升高、呕吐、腹泻、厌食、无乳或泌乳量急剧减少,小猪得不到足够乳汁,进一步加剧病情,营养严重失调,增加了小猪的病死率。3 周龄仔猪、生长期猪和出栏期猪感染时仅表现厌食,腹泻程度较轻,持续期相对较短,偶尔伴有呕吐,极少发生死亡。

5.3 病理变化

TGEV 引起的腹泻,尽管症状很严重,但是病理变化较轻微。肉眼可见的病理变化常局限于消化道,特别是胃和小肠。胃膨胀,胃内充满凝乳块,胃黏膜充血或出血,胃大弯部黏膜淤血。小肠壁弛缓、膨满,肠壁菲薄呈半透明。小肠内容物呈黄色、透明泡沫状的液体,含有凝乳块。空肠黏膜可见肠绒毛萎缩,哺乳仔猪肠系膜淋巴管的乳糜管消失。

组织学变化主要以空肠为主,从胃至直肠呈广范围的渗出性卡他性炎症变化。其特征是肠绒毛萎缩变短,回肠变化稍轻微。小肠变化有较明显的年龄特征,新生猪变化严重。电子显微镜观察,可见小肠上皮细胞的微绒毛、线粒体、内质网以及其他细胞质内的成分变性。在细胞质空泡内有病毒粒子存在。

6 实验室诊断

6.1 仪器、材料与试剂

除特别说明以外,本标准所用试剂均为分析纯,水为符合 GB/T 6682 规定的灭菌双蒸水或超纯水。

倒置显微镜、冷冻离心机、微孔滤膜、滤器、细胞培养瓶、盖玻片、温箱、荧光显微镜、冷冻切片机、载玻片、滴管、定量加液器、微量吸液器及配套吸头、96 孔或 40 孔聚乙烯微量反应板、单通道、8 通道微量吸液器及配套吸头、二氧化碳培养箱、微量振荡器及小培养瓶、酶标检测仪等。仔猪肾原代细胞或 PK15、ST 细胞系。荧光抗体(FA),猪抗 TGE - IgG 及猪抗 TGE - IgG - HRP,病毒抗原和标准阴性血清、阳性血清,抗原和酶标抗体。磷酸盐缓冲液(PBS)、细胞培养液、病毒培养液、HEPES 液、0.1%伊文斯蓝原液、磷酸盐缓冲甘油、吸液、包被稀释液、样品稀释液、酶标抗体稀释液、底物溶液、终止液(配制方法见附录 A)。

6.2 病毒分离鉴定

6.2.1 病料处理

将采集的小段空肠剪碎及肠内容物或粪使用含 10 000 IU/mL 青霉素、10 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的磷酸盐缓冲液(PBS)(见 A. 1)制成 5 倍悬液,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 3 000 r/min 离心 30 min,取上清液,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,分装,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

6.2.2 接种及观察

将过滤液(病毒培养液的 10%)接种细胞单层上,37 $^{\circ}\text{C}$ 吸附 1 h 后补加病毒培养液,逐日观察细胞病变(CPE),连续 3 d~4 d,按 CPE 变化情况可盲传 2 代~3 代。

6.2.3 病毒鉴定

CPE 变化的特点:细胞颗粒增多,圆缩,呈小堆状或葡萄串样均匀分布,细胞破损,脱落。对不同细胞培养物,CPE 可能有些差异。分离病毒用细胞瓶中加盖玻片培养,收毒时取出盖玻片(包括接毒与不接毒对照片)用直接荧光法做鉴定。鉴定方法和结果判定见 6.3。

6.3 直接免疫荧光法

6.3.1 样品

组织样本:从急性病例采取空肠(中段)或肠系膜淋巴结。

6.3.2 操作方法

6.3.2.1 标本片的制备

将组织样本制成 $4\ \mu\text{m}\sim 7\ \mu\text{m}$ 冰冻切片。或将组织样本制成涂片:肠系膜淋巴结用横断面涂抹片;空肠则刮取黏膜面做压片。标本片制好后,风干。于丙酮中固定 15 min。再置于 PBS 中浸泡 10 min~15 min,风干。

细胞培养盖玻片:将分离毒细胞培养 24 h~48 h 的盖玻片及阳性、阴性对照片在 PBS 中冲洗 3 次,风干。于丙酮中固定 15 min,再置于 PBS 中浸泡 10 min~15 min,风干。

6.3.2.2 染色

用 0.02% 伊文思蓝溶液(见 A.5)将 FA 稀释至工作浓度(1:8 以上合格)。4 000 r/min 离心 10 min,取上清液滴于标本上,37℃ 恒温恒湿染色 30 min,取出后用 PBS 冲洗 3 次,依次为 3 min、4 min 和 5 min,风干。

6.3.2.3 封固

滴加磷酸盐缓冲甘油(见 A.6),用盖玻片封固。尽快做荧光显微镜检查。如当日检查不完则将荧光片置于 4℃ 冰箱中,不超过 48 h 内检查。

6.3.3 结果判定

被检标本的细胞结构应完整清晰,并在阳性、阴性对照均成立时判定。细胞核暗黑色、胞浆呈苹果绿色判为阳性;所有细胞浆中无特异性荧光判定为阴性。

按荧光强度划为 4 级:

- a) ++++: 胞浆内可见闪亮苹果绿色荧光;
- b) +++: 胞浆内为明亮的苹果绿色荧光;
- c) ++: 胞浆内呈一般苹果绿色荧光;
- d) +: 胞浆内可见微弱荧光,但清晰可见。

凡出现 a)~d) 不同强度荧光者均判定为阳性。当无特异性荧光,细胞浆被伊文思蓝染成红色,胞核黑红色者判为阴性。

6.4 双抗体夹心 ELISA

6.4.1 材料准备

6.4.1.1 洗液、包被稀释液、样品稀释液、酶标抗体稀释液、底物溶液、终止液配制方法见附录 A。

6.4.1.2 待检样品:取发病仔猪粪便或仔猪肠内容物,用浓盐水 1:5 稀释,3 000 r/min 离心 20 min,取上清液,分装, -20℃ 保存备用。

6.4.2 操作方法

6.4.2.1 冲洗包被板

向各孔注入洗液(见 A.7),浸泡 3 min,甩干,再注入洗液,重复 3 次。甩去孔内残液,在滤纸上吸干。

6.4.2.2 包被抗体

用包被稀释液(见 A.8)稀释猪抗 TGE-IgG 至使用倍数,每孔加 100 μL ,置于 4℃ 过夜,弃液,冲洗同 6.4.2.1。

6.4.2.3 加样品

将制备的被检样品用样品稀释液(见 A.9)做 5 倍稀释,加入两个孔,每孔 100 μL 。每块反应板设阴性抗原、阳性抗原及稀释液对照各两孔,置于 37℃ 作用 2 h,弃样品,冲液,冲洗同 6.4.2.1。

6.4.2.4 加酶标记抗体

每孔加 100 μL 经酶标抗体稀释液(见 A.10)稀释至使用浓度的猪抗 TGE-IgG-HRP,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 2 h,冲洗同 6.4.2.1。

6.4.2.5 加底物溶液

每孔加新配制的底物溶液(见 A.11)100 μL ,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min。

6.4.2.6 终止反应

每孔加终止液(见 A.12)50 μL ,置于室温 15 min。

6.4.3 结果判定

用酶标测试仪在波长 492 nm 下,测定吸光度(OD)值。阳性抗原对照两孔平均 OD 值 >0.8 (参考值),阴性抗原对照两孔平均 OD 值 ≤ 0.2 为正常反应。按以下两个条件判定结果: P/N (被检抗原 OD 值/标准阴性抗原 OD 值)值 ≥ 2 ,且被检抗原两孔平均 OD 值 ≥ 0.2 判为阳性;否则为阴性。如其中一个条件稍低于判定标准,可复检一次,最后仍按照两个条件判定结果。

6.5 RT-PCR

6.5.1 仪器、材料与试剂

PCR 扩增仪、1.5 mL 离心管、0.2 mL PCR 反应管、电热恒温水槽、台式高速低温离心机、电泳仪、微量移液器及配套吸头、微波炉、紫外凝胶成像仪、冰箱。TRIzol[®]试剂、核糖核酸酶(RNase)抑制剂(40 U/ μL)、反转录酶(M-MLV)(200 U/ μL)、dNTPs 混合物(各 10 mM)、无 RNase dH₂O、EmeraldAmp[™] PCR Master Mix (2 \times)、DL2 000 DNA Marker、10 \times 或 6 \times DNA 上样缓冲液、PBS(配制方法见附录 A)、TAE 电泳缓冲液(配制方法见附录 B)、三氯甲烷、异丙醇、三羟甲基氨基甲烷(Tris 碱)、琼脂糖、乙二胺四乙酸二钠(Na₂EDTA)、冰乙酸、氯化钠、溴化乙锭、灭菌双蒸水。

6.5.2 引物

6.5.2.1 反转录引物(F₂)

5'-TTAGTTCAAACAAGGAGT-3';

引物贮存浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$,使用时终浓度为 500 pmol/L。

6.5.2.2 PCR 反应引物

F1(上游引物):5'-ATATGCAGTAGAAGACAAT-3';

F2(下游引物):5'-TTAGTTCAAACAAGGAGT-3'。

引物贮存浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$,使用时终浓度为 20 pmol/L。

6.5.3 样品制备

将小肠内容物或粪便与灭菌 PBS 按 1:5 的重量体积比制成悬液,在涡旋混合器上混匀后 4 $^{\circ}\text{C}$ 5 000 r/min 离心 10 min,取上清液于无 RNA 酶的灭菌离心管中,备用。制备的样品在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存时不应超过 24 h,长期保存应分装成小管,置于-70 $^{\circ}\text{C}$ 以下,避免反复冻融。

6.5.4 病毒总 RNA 提取

取 6.5.3 制备的待检样品上清 300 μL 于无 RNA 酶的灭菌离心管(1.5 mL)中,加入 500 μL RNA 提取液(TRIzol[®] Reagent),充分混匀,室温静置 10 min;加入 500 μL 三氯甲烷,充分混匀,室温静置 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 10 min,取上清(500 μL)于新的离心管(1.5 mL)中,加入 1.0 mL 异丙醇,充分混匀,-20 $^{\circ}\text{C}$ 静置 30 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 10 min。小心弃上清,倒置于吸水纸上,室温自然风干。加入 20 μL 无 RNase dH₂O 溶解沉淀,瞬时离心,进行 cDNA 合成或置-70 $^{\circ}\text{C}$ 以下长期保存。若条件允许,病毒总 RNA 还可用病毒 RNA 提取试剂盒提取。

6.5.5 cDNA 合成

反应在 20 μL 体系中进行。取 6.5.4 制备的总 RNA 12.5 μL 于无 RNA 酶的灭菌离心管(1.5 mL)中,加入 1 μL 反转录引物(F2)混匀,70 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min 后迅速在冰上冷却 2 min,瞬时离心使模板 RNA/

引物混合液聚集于管底；然后，依次加入 4 μL 5 \times M-MLV 缓冲液、1 μL dNTPs 混合物（各 10 mM）、0.5 μL RNase 抑制剂、1.0 μL 反转录酶 M-MLV 混匀，42 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1 h；最后，70 $^{\circ}\text{C}$ 保温 15 min 后冰上冷却，得到 cDNA 溶液，立即使用或置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

6.5.6 PCR 反应

6.5.6.1 反应体系(25 μL)

2 \times EmeraldAmp TM PCR Master Mix	12.5 μL
F1	0.05 μL
F2	0.05 μL
模板(cDNA)	2 μL
无菌双蒸水加至	25 μL

PCR 反应时，要设立阳性对照和空白对照。阳性对照模板为猪传染性胃肠炎病毒 ORF3 基因重组质粒，空白对照模板为提取的总 RNA。

6.5.6.2 PCR 反应程序

94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min，然后 30 个循环(98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s、55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 84 s)，最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min，4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

6.5.7 电泳

6.5.7.1 制胶

1%琼脂糖凝胶板的制备：将 1 g 琼脂糖放入 100 mL 1 \times TAE 电泳缓冲液中，微波炉加热融化。待温度降至 60 $^{\circ}\text{C}$ 左右时，加入 10 mg/mL 溴化乙锭(EB)5 μL ，均匀铺板，厚度为 3 mm~5 mm。

6.5.7.2 加样

PCR 反应结束后，取 5 μL 扩增产物（包括被检样品、阳性对照、空白对照）、5 μL DL2 000 DNA Marker 进行琼脂糖凝胶电泳。

6.5.7.3 电泳条件

150 V 电泳 10 min~15 min。

6.5.7.4 凝胶成像仪观察

反应产物电泳结束后，用凝胶成像仪观察检测结果、拍照、记录试验结果。

6.5.8 结果判定

在同一块凝胶板上电泳后，当 DNA 分子质量标准、各组对照同时成立时，被检样品电泳道出现一条 1 400 bp 的条带，判为阳性(+)；被检样品电泳道没有出现大小为 1 400 bp 的条带，判为阴性(-)。结果判定见附录 C。

6.6 血清中和试验

6.6.1 指示病毒

指示病毒毒价测定后立即小量分装，置于 -30 $^{\circ}\text{C}$ 冻存，避免反复冻融，使用剂量为 500 TCID₅₀ ~ 1 000 TCID₅₀。

6.6.2 样品

被检血清，同一动物的健康血清(或病初)血清和康复 3 周后血清(双份)，被单份血清也可以进行检测，被检样品需 56 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 30 min。

6.6.3 溶液配制

稀释液、细胞培养液、病毒培养液、HEPES 液，配制方法见附录 A。

6.6.4 操作方法

6.6.4.1 常量法

用稀释液倍比稀释血清,与稀释至工作浓度的指示毒等量混合,置于 37℃ 感作 1 h(中间摇动 2 次)。选择长满单层的细胞瓶,每份样品接 4 个培养瓶,再置于 37℃ 吸附 1 h(中间摇动 2 次)。取出后,加病毒培养液,置于 37℃ 温箱培养,逐日观察细胞病变(CPE)72 h~96 h 最终判定。每批对照设标准阴性血清对照、阳性血清对照,病毒抗原和细胞对照各 2 瓶,均加工作浓度指示毒,阴性血清、阳性血清做 2⁶ 稀释。

6.6.4.2 微量法

用稀释液倍比稀释血清,每个稀释度加 4 孔,每孔 50 μL,再分别加入 50 μL 工作浓度指示毒,经微量振荡器振荡 1 min~2 min,置于 37℃ 中和 1 h 后,每孔加入细胞悬液 100 μL(1.5×10⁵ 个细胞/mL~2.0×10⁵ 个细胞/mL),微量板置于 37℃ 二氧化碳培养箱,或用胶带封口置 37℃ 温箱培养,72 h~96 h 判定结果,对照组设置同常量法。

6.6.5 结果判定

在对照系统成立时(病毒抗原及阴性血清对照组均出现 CPE,阳性血清及细胞对照组均无 CPE),以能保护半数接种细胞不出现细胞病变的血清稀释度作为终点,并以抑制细胞病变的最高血清稀释度的倒数来表示中和抗体滴度。

发病后 3 周以上的康复血清滴度是健康(或病初)血清滴度的 4 倍,或单份血清的中和抗体滴度达 1:8 或以上,均判为阳性。

6.7 间接 ELISA

6.7.1 操作方法

6.7.1.1 冲洗包被板

向各孔注入无离子水,浸泡 3 min,再注入洗液(见 A.7),重复 3 次。甩干孔内残液,在滤纸上吸干。

6.7.1.2 抗原包被

用包被稀释液(见 A.8)稀释抗原至使用浓度,包被量为每孔 100 μL。置于 4℃ 冰箱湿盒内 24 h,弃掉包被液,用洗液冲洗 3 次,每次 3 min。

6.7.1.3 加被检及对照血清

将每份被检血清样品用血清稀释液(见 A.12)做 1:100 稀释,加入 2 个孔,每个孔 100 μL。每块反应板设阳性血清、阴性血清及稀释液对照各 2 孔,每孔 100 μL 盖好包被板置于 37℃ 湿盒内 1 h,冲洗同 6.7.1.2。

6.7.1.4 加酶标抗体

用酶标抗体稀释液(见 A.10)将酶标抗体稀释至使用浓度,每孔加 100 μL,置于 37℃ 湿盒内 1 h,冲洗同 6.7.1.2。

6.7.1.5 加底物溶液

每孔加新配制的底物溶液 100 μL,在 37℃ 湿盒内反应 5 min~10 min。

6.7.1.6 终止反应

每孔加终止液 50 μL。

6.7.2 结果判定

6.7.2.1 目测法

阳性对照血清孔呈鲜明的橘黄色,阴性对照血清孔无色或基本无色。被检血清孔凡显色者即判抗体阳性。

6.7.2.2 比色法

用酶标测试仪,在波长 492 nm 下,测定各孔 OD 值。阳性对照血清的两孔平均 OD 值>0.7(参考值),阴性对照血清的两孔平均 OD 值≤0.183 为正常反应。OD 值≥0.2 为阳性;OD 值<0.183 时为阴性;OD 值在 0.183~0.2 之间为疑似。对疑似样品可复检一次,如仍为疑似范围,则看 P/N 比值,P/N

比值 ≥ 2 判为阳性, P/N 比值 < 2 者判为阴性。

7 结果判定

只要实验室诊断中的任何一种方法的结果成立,即可判断该病为猪传染性胃肠炎。

附 录 A
(规范性附录)
溶液的配制

A.1 0.02 mol/L pH 7.2 磷酸盐缓冲液(PBS)的配制

A.1.1 0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液

磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)71.64 g,无离子水加至1 000 mL。

A.1.2 0.2 mol/L 磷酸二氢钠溶液

磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)31.21 g,无离子水加至1 000 mL。

A.1.3 0.2 mL/L 磷酸氢二钠溶液 360 mL

0.2 mol/L 磷酸二氢钠溶液 140 mL,氯化钠 38 g,无离子加至5 000 mL。4℃保存。

A.2 细胞培养液的配制

含10%灭活犊牛血清的1640营养液,加100 IU/mL青霉素及100 μg/mL链霉素,用5.6%碳酸氢钠(NaHCO_3)调pH至7.2。如需换液,则血清含量为5%。

A.3 病毒培养液的配制

1640培养液中加下列成分,使最终浓度各达到:1%HEPES,1%二甲基亚砜(DMSO),5 μg/mL~10 μg/mL胰酶(原代肾细胞)5 μg/mL,100 IU/mL青霉素、100 μg/mL链霉素,以5.6%碳酸氢钠(NaHCO_3)调至pH7.2。

A.4 HEPES 液的配制

称取0.238 5 g HEPES溶于100 mL无离子水中,用1 mol/L氢氧化钠(NaOH)调整pH至7.0~7.2,过滤后置于4℃备用。

A.5 0.1%伊文斯蓝原液的配制

称取伊文斯蓝0.1 g溶于100 mL,0.02 mol/L pH 7.2 PBS中,4℃保存。使用时,稀释成0.02%浓度。

A.6 磷酸盐缓冲甘油的配制

量取丙三醇90 mL,0.02 mol/L pH 7.2 PBS 10 mL,振荡混合均匀即成,4℃保存。

A.7 洗液的配制

量取50 μL吐温-20,加入100 mL 0.02 mol/L pH7.2磷酸盐缓冲液(见A.1)中。

A.8 包被稀释液的配制

A.8.1 0.1 mol/L 碳酸钠液:称取碳酸钠10.6 g,加无离子水至1 000 mL。

A.8.2 0.1 mol/L 碳酸氢钠液:称取碳酸氢钠8.4 g,加无离子水至1 000 mL。

A. 8.3 量取 0.1 mol/L 碳酸钠液 200 mL, 0.1 mol/L 碳酸氢钠液 700 mL, 混合即成。

A. 9 样品稀释液的配制

加 0.05%吐温-20 及 1%明胶的 0.02 mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲液。

A. 10 酶标抗体稀释液的配制

加 0.05%吐温-20, 1%明胶及 5%灭活牛血清的 0.02 mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲液。

A. 11 底物溶液的配制

A. 11.1 pH5.0 磷酸盐-柠檬酸缓冲液: 称取柠檬酸 21.01 g, 加无离子水至 1 000 mL, 量取 243 mL 与 0.2 mol/L 磷酸氢二钠液(见 A. 1)257 mL 混合, 于 4℃ 冰箱中保存不超过 1 周。

A. 11.2 称取 40 mg 邻苯二胺, 溶于 100 mL pH5.0 磷酸盐-柠檬酸缓冲液(用前从 4℃ 冰箱中取出, 在室温下放置 20 min~30 min)。待溶解后, 加入 150 μ L 过氧化氢, 根据试验需要量可按比例增减。

A. 12 终止液的配制

2 mol/L 硫酸, 量取浓硫酸 4 mL 加入 32 mL 无离子水中混匀。

附 录 B

(规范性附录)

TAE 电泳缓冲液(pH 约 8.5)的配制

50×TAE 电泳缓冲液储存液:

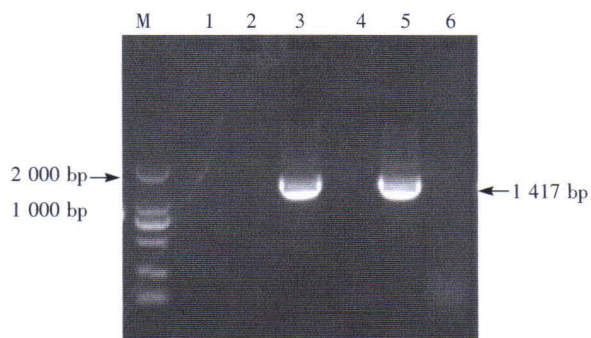
三羟甲基氨基甲烷(Tris 碱)	242 g
乙二胺四乙酸二钠(Na ₂ EDTA)	37.2 g
双蒸水	800 mL

待上述混合物完全溶解后,加入 57.1 mL 的醋酸充分搅拌溶解,加双蒸水至 1 L 后,置于室温下保存。

应用前,用双蒸水将 50×TAE 电泳缓冲液 50 倍稀释。

附录 C
(规范性附录)
样品检测结果判定图

样品检测结果判定见图 C.1。



说明:

- | | | |
|-------|------------------------|----------|
| M | ——DL 2 000 DNA Marker; | 5——阳性对照; |
| 1,2,4 | ——阴性样品; | 6——阴性对照。 |
| 3 | ——阳性样品; | |

图 C.1 猪传染性胃肠炎病毒 PCR 检测结果