

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1187—2019

代替 NY/T 681—2003, NY/T 1187—2006

鸡传染性贫血诊断技术

Diagnostic techniques for chicken infectious anemia

2019-08-01 发布

2019-11-01 实施



中华人民共和国农业农村部 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 681—2003《鸡传染性贫血诊断技术》和 NY/T 1187—2006《鸡传染性贫血病毒聚合酶链反应试验方法》。与 NY/T 681—2003、NY/T 1187—2006 相比,除编辑性修改外主要技术变化如下:

——增加了实验室检测技术部分荧光聚合酶链反应试验的检测方法。

本标准由农业农村部畜牧兽医局提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:中国动物疫病预防控制中心、山东农业大学。

本标准起草人:王传彬、顾小雪、赵鹏、张硕、韩雪、任志浩、蒋菲、宋晓晖、杨林、刘洋、刘玉良、王睿男、毕一鸣。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

——NY/T 681—2003;

——NY/T 1187—2006。

鸡传染性贫血诊断技术

1 范围

本标准规定了鸡传染性贫血(CIA)临床诊断和病毒分离与鉴定、酶联免疫吸附试验、免疫酶试验、聚合酶链反应试验和荧光聚合酶链反应试验及综合判定技术。

本标准适用于鸡传染性贫血的诊断、监测、产地检疫及流行病学调查。

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试验方法

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

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

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

鸡传染性贫血 chicken infectious anemia

鸡贫血因子病

由鸡贫血病毒引起的雏鸡再生障碍性贫血、全身淋巴组织萎缩、皮下和肌肉出血为特征的一种免疫抑制性疾病。

4 缩略语

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

dNTP:脱氧核糖核苷三磷酸(deoxy-ribonucleoside triphosphate)

PCR:聚合酶链式反应(polymerase chain reaction)

Taq 酶:Taq DNA 聚合酶(Taq DNA polymerase)

5 临床诊断

5.1 流行病学

5.1.1 本病各品种、年龄的鸡均易感,自然发病多见于2周龄~4周龄鸡。

5.1.2 成年鸡或有母源抗体的雏鸡感染无明显临床症状。

5.1.3 种鸡感染后,可通过种蛋垂直传播给下一代。

5.1.4 当有马立克氏病、传染性法氏囊病、禽网状内皮组织增殖症等免疫抑制性疾病发生时,雏鸡对鸡传染性贫血病毒(CIAV)的易感性增高,发病早且严重。

5.2 临床症状

雏鸡感染CIA的主要临床特征是贫血、病鸡精神沉郁、虚弱、消瘦,聚堆及行动迟缓,羽毛蓬乱,喙、肉髯、面部和可视黏膜苍白,羽毛囊有淤血和出血性病灶,生长不良。

5.3 病理变化

5.3.1 病鸡表现再生障碍性贫血、消瘦,骨髓被脂肪组织取代呈黄白色,肌肉及内脏器官苍白,肝脏、肾脏

肿大并褪色,血液稀薄,凝血时间延长,红细胞压积下降。

5.3.2 病鸡表现全身性淋巴组织萎缩,胸腺、法氏囊、脾脏和盲肠扁桃体以及其他组织内淋巴细胞严重缺失。

5.4 结果判定

符合 5.1 的流行病学特征,病鸡出现 5.2 临床症状和 5.3 中的病理变化,可判为鸡传染性贫血疑似病例,应进行实验室确诊。

6 实验室诊断

6.1 病原分离鉴定

6.1.1 试剂或材料

6.1.1.1 DMEM(高糖)培养基:配制见附录 A 中的 A.1。

6.1.1.2 新生牛血清。

6.1.1.3 青、链霉素:青霉素 10 000 U/mL,链霉素 10 000 μg/mL。

6.1.1.4 淋巴细胞系 MDCC-MSB1 细胞。

6.1.1.5 标准阳性血清:用 CIAV 抗原免疫 SPF 鸡制备的血清。

6.1.1.6 标准阴性血清:SPF 鸡血清。

6.1.1.7 细胞培养瓶。

6.1.1.8 吸管。

6.1.1.9 离心机及离心管。

6.1.1.10 研磨器械。

6.1.1.11 可调移液器(最大量程为 2 μL、20 μL、200 μL、1 000 μL)及相应吸头。

6.1.1.12 0.45 μm 微孔滤膜。

6.1.2 仪器设备

6.1.2.1 二氧化碳培养箱。

6.1.2.2 恒温水浴箱。

6.1.2.3 普通冰箱及低温冰箱。

6.1.2.4 倒置显微镜。

6.1.3 样品

按 NY/T 541 无菌采集病鸡胸腺、骨髓、脾脏、盲肠扁桃体、肝脏、肺脏、法氏囊等器官组织 1 g~2 g,研磨后用无血清 DMEM(高糖)培养基制成 20%组织悬浮液,以 3 000 g 离心 30 min。取上清液,70℃水浴处理 5 min 后加等量(体积比)10%三氯甲烷室温处理 15 min,10 000 g 离心 20 min,取上清液用于 CIAV 分离。

6.1.4 操作方法

6.1.4.1 用 MDCC-MSB1 细胞在含 15%新生牛血清的 DMEM(高糖)培养基、39℃和 5%二氧化碳恒温培养箱中培养。每 2 d~3 d 传代一次,细胞长至 2×10^5 个/mL~ 5×10^5 个/mL。

6.1.4.2 将 0.1 mL 处理好的组织悬浮液接种上述培养的 MDCC-MSB1 细胞,在 39℃和 5%二氧化碳环境下培养 48 h,观察结果。CIAV 感染后的细胞病变表现为细胞体积增大,随后溶解。若第一次接种未出现细胞病变,应将细胞培养物冻融后盲传三代。

6.1.4.3 将出现病变的细胞用 6.3、6.4、6.5 的任意一种方法进行鉴定。

6.1.5 结果判定

a) CIAV 分离鉴定阳性:出现病变的细胞用 6.3、6.4、6.5 的任意一种方法检测为阳性。

b) CIAV 分离鉴定阴性:样品接种细胞后盲传三代均无细胞病变,或者用 6.3、6.4、6.5 三种方法检测均为阴性,则判为阴性。

6.2 酶联免疫吸附试验

6.2.1 试剂或材料

- 6.2.1.1 酶标板:用 CIAV 抗原包被的酶标板。
- 6.2.1.2 标准阳性血清:用 CIAV 抗原免疫 SPF 鸡制备的血清,SPF 鸡应符合 GB/T 27401 的规定。
- 6.2.1.3 标准阴性血清:SPF 鸡血清。
- 6.2.1.4 酶结合物:HRP 标记抗 CIAV 单克隆抗体。
- 6.2.1.5 磷酸盐缓冲液(PBS):配制见 A.2。
- 6.2.1.6 洗涤液:配制见 A.3。
- 6.2.1.7 样品稀释液:配制见 A.4。
- 6.2.1.8 底物溶液:配制见 A.5。
- 6.2.1.9 终止液:配制见 A.6。
- 6.2.1.10 可调移液器(最大量程为 50 μL 、200 μL 、300 μL)及相应吸头。

6.2.2 仪器设备

酶联检测仪。

6.2.3 样品

采集被检鸡血液,分离血清。血清应新鲜、透明、不溶血、无污染,密装于灭菌小瓶内,立即送检或于 -20°C 保存。试验前,将被检血清统一编号,并用样品稀释液作 10 倍稀释。

6.2.4 操作方法

- 6.2.4.1 取出酶标板,并将样品位置记录在记录单上。向 A1 和 B1 孔中分别加入 100 μL 未经稀释的阴性对照血清,C1 和 D1 孔中分别加入 100 μL 未经稀释的阳性对照血清,其他各孔中加入 100 μL 稀释好的待检样品,每一样品加 2 孔。
- 6.2.4.2 置室温 1 h。用洗涤液将反应板洗涤 3 次~5 次。
- 6.2.4.3 每孔加入 100 μL 酶结合物。置室温 30 min。
- 6.2.4.4 用洗涤液将反应板洗涤 3 次~5 次。
- 6.2.4.5 每孔加入 100 μL 底物液。室温放置 15 min。
- 6.2.4.6 每孔加入 100 μL 终止液,立即用酶标仪于波长 650 nm 测定各孔 OD 值。
- 6.2.4.7 也可采用等效的试剂盒操作。

6.2.5 结果判定

6.2.5.1 试验成立条件:

- a) 标准阴性血清 $\text{OD}_{650} \leq 0.6$ 。
- b) $\frac{\text{标准阳性血清 OD}_{650}}{\text{标准阴性血清 OD}_{650}} \leq 0.5$ 。

6.2.5.2 计算待检血清 S/N 值: $\frac{S}{N} = \frac{\text{待检血清 OD}_{650}}{\text{阴性血清 OD}_{650}}$ 。

6.2.5.3 结果判定:

- a) 样品 $S/N \leq 0.6$,判为 CIAV 抗体阳性。
- b) 样品 $S/N > 0.6$,判为 CIAV 抗体阴性。

6.3 免疫酶试验

6.3.1 试剂或材料

6.3.1.1 抗原涂片的制备:MDCC-MSB1 细胞在含 15%胎牛血清 DMEM 培养基中培养。当细胞长至 5×10^5 个/mL,接种 CIAV,并换成含 5%新生牛血清的 DMEM 培养基,培养 36 h~48 h。病变 50%~75%时,离心收集感染细胞,PBS 洗涤 3 次后,稀释至细胞为 1×10^6 个/mL。取印有 10 个~40 个小孔的

箱式载玻片,每孔滴加 10 μL 。室温自然干燥后,冷丙酮(4 $^{\circ}\text{C}$)固定 10 min。密封包装,置-20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

6.3.1.2 标准阳性血清:用 CIAV 抗原免疫 SPF 鸡获得的血清。

6.3.1.3 标准阴性血清:SPF 鸡血清。

6.3.1.4 酶结合物:HRP 标记的抗鸡二抗。

6.3.1.5 磷酸盐缓冲液(PBS):配制见 A.2。

6.3.1.6 底物溶液:配制见 A.7。

6.3.1.7 印有 10 个~40 个小孔的箱式载玻片。

6.3.1.8 可调移液器(最大量程为 50 μL)及相应吸头。

6.3.2 仪器设备

6.3.2.1 普通光学显微镜。

6.3.2.2 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱或水浴箱。

6.3.3 样品

采集被检鸡血液,分离血清。血清应新鲜、透明、不溶血、无污染,密装于灭菌小瓶内,4 $^{\circ}\text{C}$ 或-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存或立即送检。试验前,将被检血清统一编号,并用 PBS 作 10 倍稀释。

6.3.4 操作方法

6.3.4.1 取出抗原涂片,恢复到室温,滴加 10 倍稀释的待检血清和标准阴性血清、标准阳性血清。每份血清加 2 个病毒细胞孔和 1 个正常细胞孔,置湿盒内,37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min。

6.3.4.2 PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。

6.3.4.3 滴加适当稀释的酶结合物,置湿盒内,37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min。

6.3.4.4 PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。

6.3.4.5 将室玻片放入底物溶液中,室温下显色 5 min~10 min。PBS 漂洗 2 次,再用水漂洗 1 次。吹干后,在普通光学显微镜下观察,判定结果。

6.3.5 结果判定

6.3.5.1 试验成立条件:

a) 阴性血清对照:阴性血清与正常细胞和病毒感染细胞反应均无色。

b) 阳性血清对照:阳性血清与正常细胞反应无色,与病毒感染细胞反应呈棕黄色至棕褐色。

6.3.5.2 结果判定:

a) 阳性:血清与正常细胞反应呈无色,而与病毒感染细胞反应呈棕黄色至棕褐色。

b) 阴性:血清与正常细胞和病毒感染细胞反应均呈无色。

6.4 聚合酶链反应试验

除非另有规定,本方法所用化学试剂均为分析纯;试验用水符合 GB/T 6682 二级水的规定。

6.4.1 试剂或材料

6.4.1.1 消化液:见 A.8。

6.4.1.2 2%蛋白酶 K 溶液。

6.4.1.3 酚/氯仿/异戊醇混合液:见 A.9。

6.4.1.4 2.5 mmol/L dNTP。

6.4.1.5 8 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物混合液:引物序列见 A.10。

6.4.1.6 0.5 U/ μL *Taq* DNA 聚合酶。

6.4.1.7 10 \times PCR 缓冲液。

6.4.1.8 1%溴化乙锭(EB)溶液或采用等效的试剂。

6.4.1.9 TAE 电泳缓冲液。

6.4.1.10 1%琼脂糖凝胶。

- 6.4.1.11 上样缓冲液:见 A.11。
- 6.4.1.12 异丙醇。
- 6.4.1.13 分子量标准物:2 000 bp Ladder Marker。
- 6.4.1.14 75%乙醇溶液。
- 6.4.1.15 15 mmol/L 氯化镁溶液。
- 6.4.1.16 组织研磨器。
- 6.4.1.17 可调移液器(最大量程为 2 μ L、20 μ L、200 μ L、1 000 μ L)。

6.4.2 仪器设备

- 6.4.2.1 分析天平。
- 6.4.2.2 高速离心机。
- 6.4.2.3 真空干燥器。
- 6.4.2.4 PCR 扩增仪。
- 6.4.2.5 电泳仪。
- 6.4.2.6 电泳槽。
- 6.4.2.7 紫外凝胶成像仪(或紫外分析仪)。
- 6.4.2.8 液氮罐或-70℃冰箱。
- 6.4.2.9 微波炉。
- 6.4.2.10 -20℃冰箱。
- 6.4.2.11 水浴锅。

6.4.3 样品

6.4.3.1 样品的采集

6.4.3.1.1 组织样品

无菌采集病死鸡的胸腺、骨髓、脾脏、盲肠扁桃体、肝脏等组织。

6.4.3.1.2 血液样品

用注射器无菌采取待检活鸡血 2 mL~4 mL,立即送往实验室。

6.4.3.2 样品的处理

6.4.3.2.1 组织样品处理

取待检病料约 0.2 g,置于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液 200 μ L,置于 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,置于 55℃水浴中 12 h。

6.4.3.2.2 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。取上清液 200 μ L,置于 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,置于 55℃水浴中 12 h。

6.4.3.2.3 阳性对照处理

取 CIAV 细胞培养液 200 μ L,置于 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,置于 55℃水浴中 12 h。

6.4.3.2.4 阴性对照处理

取 SPF 鸡血清 200 μ L,置于 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,置于 55℃水浴中 12 h。

6.4.4 操作方法

6.4.4.1 病毒 DNA 模板的提取

- 6.4.4.1.1 选择使用 A.9 中所列试剂提取病毒 DNA,按下列步骤进行:

- a) 取出已处理的待检样品及阴性、阳性对照样品,每管加入 600 μL 酚/氯仿/异戊醇混合液,颠倒 10 次混匀,13 000 g 离心 10 min。
- b) 取上清液置于 1.5 mL 灭菌离心管中,加入等体积异丙醇,混匀,置于液氮中 3 min 或 -70°C 冰箱中 30 min。
- c) 取出样品管,室温融化, 4°C 20 000 g 离心 15 min。
- d) 弃上清液,沿离心管开口方向管壁缓缓滴入 -20°C 预冷的 75%乙醇溶液 1 mL,轻轻旋转洗一次后倒掉,将离心管倒扣于吸水纸上 1 min,真空抽干 15 min。
- e) 取出样品管,用 50 μL 水溶解沉淀,作为模板备用。

6.4.4.1.2 使用病毒 DNA 柱式法提取试剂盒或病毒 DNA 磁珠法提取试剂盒提取病毒 DNA 时,则按照试剂盒说明书进行操作,且样品不需要用消化液和蛋白酶 K 溶液处理。

6.4.4.2 PCR 扩增

反应体系见表 1。将各成分混匀,作好标记,加入矿物油 20 μL ,覆盖(有热盖的自动 DNA 热循环仪不用矿物油)。扩增条件为 94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 30 s,35 个循环后, 72°C 延伸 7 min。

表 1 PCR 反应体系配置表

组 分	体积, μL
2.5 mmol/L dNTP	2
8 $\mu\text{mol/L}$ CIAV 上下游引物混合液	2
15 mmol/L 氯化镁	2
10 \times PCR 缓冲液	2
0.5 U/ μL <i>Taq</i> DNA 聚合酶	2
水	8
DNA 模板	2

6.4.4.3 电泳

将 PCR 扩增产物 15 μL 与 3 μL 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 2 000 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。

6.4.5 结果判定

6.4.5.1 试验成立条件

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。

6.4.5.2 结果判定

- a) 被检样品出现 675 bp 扩增带为 CIAV 阳性;
- b) 未出现相应扩增带的样品判为阴性(参见附录 B 中的图 B.1)。

6.5 荧光聚合酶链反应试验

6.5.1 试剂或材料

- 6.5.1.1 消化液:见 A.8。
- 6.5.1.2 2%蛋白酶 K 溶液。
- 6.5.1.3 酚/氯仿/异戊醇混合液:见 A.9。
- 6.5.1.4 10 $\mu\text{mol/L}$ 上游引物、10 $\mu\text{mol/L}$ 下游引物:序列见 A.10。
- 6.5.1.5 25 $\mu\text{mol/L}$ 探针:序列见 A.12。
- 6.5.1.6 Premix Ex *Taq* (2 \times)(Probe qPCR) ROX plus 缓冲液或采用等效的试剂。
- 6.5.1.7 组织研磨器。
- 6.5.1.8 可调移液器(最大量程为 2 μL 、20 μL 、200 μL 、1 000 μL)。

6.5.2 仪器设备

- 6.5.2.1 分析天平。

- 6.5.2.2 高速离心机。
- 6.5.2.3 核酸提取仪。
- 6.5.2.4 荧光定量 PCR 仪。
- 6.5.2.5 -20°C 冰箱。
- 6.5.2.6 水浴锅。

6.5.3 样品

同 6.4.3。

6.5.4 操作方法

6.5.4.1 病毒 DNA 模板的提取,同 6.4.4.1。

6.5.4.2 荧光 PCR 扩增:反应体系见表 2。将各成分混匀,作好标记。扩增条件为 95°C 20 s; 95°C 1 s, 60°C 34 s,40 个循环。荧光收集设置在 60°C 时进行(报告基团“FAM”,淬灭基团“BHQ”)。

表 2 荧光 PCR 反应体系配置表

组 分	体 积, μL
10 $\mu\text{mol/L}$ 上游引物	0.5
10 $\mu\text{mol/L}$ 下游引物	0.5
25 $\mu\text{mol/L}$ 探针	0.4
Premix ExTaq(2 \times)(Probe qPCR)ROX plus 缓冲液	10
二级水	6.6
DNA 模板	2

6.5.5 结果判定

6.5.5.1 阈值设定

阈值线超过阴性对照扩增曲线的最高点,且相交于阳性对照扩增曲线进入指数增长期的拐点,或根据仪器噪声情况进行调整。

6.5.5.2 试验成立条件

当阳性对照 C_t 值 ≤ 36.0 且出现典型扩增曲线,阴性对照无 C_t 值无扩增曲线时,试验成立。

6.5.5.3 结果判定

当被检样品出现典型的扩增曲线且 C_t 值 ≤ 36.0 时,判定样品 CIAV 核酸阳性;
无 C_t 值或 C_t 值 > 36.0 时,判定样品 CIAV 核酸阴性(参见附录 C 中的图 C.1)。

6.6 实验室生物安全

实验室诊断过程中,实验室生物安全要求按照 GB 19489 的规定执行。

7 综合判定

7.1 未接种 CIAV 活疫苗

符合 5 判为可疑病例,且采用 6.1、6.2、6.3、6.4、6.5 任何一种实验室检测方法呈阳性结果时,判定为 CIAV 感染。

7.2 接种过 CIAV 活疫苗

符合 5 判为可疑病例,且采用 6.1、6.2、6.3、6.4、6.5 任何一种实验室检测方法呈阳性结果时,应结合病史和疫苗接种史进行综合判定,不能直接判定为 CIAV 感染。

附录 A
(规范性附录)
试剂配制

除非另有规定,本方法所用化学试剂均为分析纯;试验用水符合 GB/T 6682 二级水的规定。

A.1 DMEM(高糖)培养液

DMEM	10 g
碳酸氢钠	3.7 g
青链霉素	10 mL
水	加至 1 000 mL

用 1 mol/L 氢氧化钠或盐酸将培养液 pH 调至 pH 6.9~7.0,用孔径 0.45 μm 的微孔滤膜正压过滤除菌,4℃冰箱保存备用。

A.2 磷酸盐缓冲液(PBS,0.01 mol/L pH 7.4)

氯化钠	8 g
氯化钾	0.2 g
磷酸二氢钾	0.2 g
十二水磷酸氢二钠	2.83 g
水	加至 1 000 mL

A.3 洗涤液

PBS	1 000 mL
吐温-20	0.5 mL

A.4 样品稀释液

新生牛血清	10 mL
洗涤液	900 mL

A.5 酶联免疫吸附试验底物溶液

用二甲基亚砜将 3'3'5'5'-四甲基联苯胺(TMB)配成 1%溶液,4℃保存。使用时,按下列配方配制底物溶液。

磷酸盐-柠檬酸缓冲液	9.9 mL
1% 3'3'5'5'-四甲基联苯胺	0.1 mL
30%过氧化氢	1 μL

A.6 终止液

氢氟酸	0.31 mL
水	100 mL

A.7 免疫酶试验底物溶液

3,3'-二氨基联苯胺盐酸盐(DAB)	40 mg
---------------------	-------

PBS	100 mL
丙酮	5 mL
30%过氧化氢	0.1 mL
滤纸过滤后使用;现用现配。	

A.8 消化液的配制

A.8.1 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
水	100 mL
浓盐酸 pH 调至 8.0。	

A.8.2 0.5mol/L 乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)溶液(pH 8.0)

二水乙二胺四乙酸二钠	18.61 g
水	100 mL
浓盐酸 pH 调至 8.0。	

A.8.3 20%十二烷基硫酸钠溶液(pH 7.2)

十二烷基硫酸钠	20 g
水	100 mL
浓盐酸 pH 调至 7.2。	

A.8.4 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 乙二胺四乙酸二钠(EDTA2Na)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
水	加至 200 mL

A.9 酚/氯仿/异戊醇混合液

碱性酚	25 mL
氯仿	24 mL
异戊醇	1 mL

A.10 聚合酶链反应试验引物序列

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.11 上样缓冲液

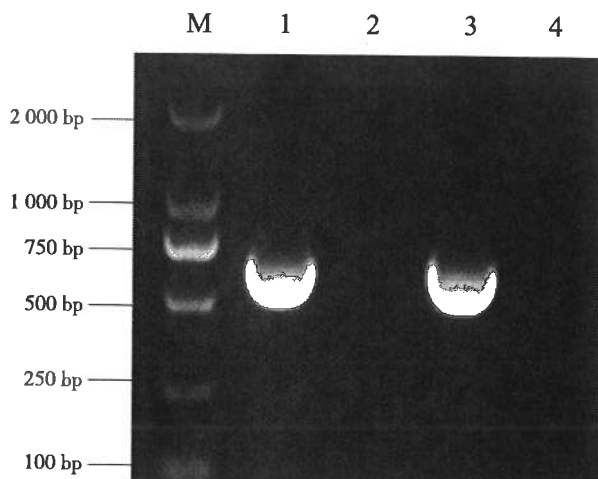
溴酚蓝 0.2 g,加二级水 10 mL 过夜溶解。50 g 蔗糖加入 50 mL 水溶解后,移入已溶解的溴酚蓝溶液中,摇匀定容至 100 mL。

A.12 荧光聚合酶链反应试验引物和探针序列

上游引物 P1:5'-GCA GGG GCA AGT AAT TTC AA-3';
下游引物 P2:5'-GCC ACA CAG CGA TAG AGT GA-3';
探针 P5':FAM-ACT GCA GAG AGA TCC GGA TTG GTA TCG-BHQ-3'。

附录 B
(资料性附录)
聚合酶链反应试验扩增图例

聚合酶链反应试验扩增图例见图 B.1。



说明:

M——DL 2 000 DNA Marker;

1 ——已知阳性样品;

2 ——已知阴性样品;

3——已知阳性对照样品;

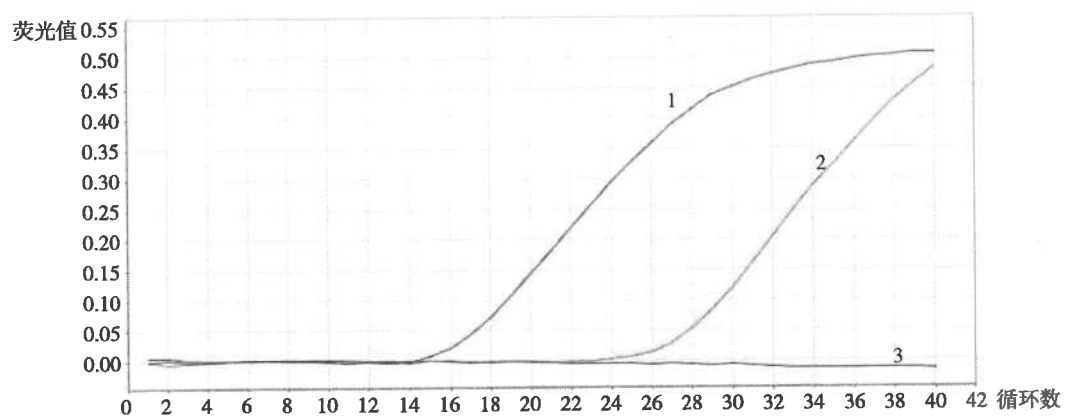
4——已知阴性对照样品。

图 B.1 聚合酶链反应试验扩增图例

附录 C
(资料性附录)

荧光聚合酶链反应试验扩增图例

荧光聚合酶链反应试验扩增图例见图 C.1。



说明：

- 1——已知阳性对照样品；
- 2——已知阳性样品；
- 3——已知阴性对照样品。

图 C.1 荧光聚合酶链反应试验扩增图例

中华人民共和国
农业行业标准
鸡传染性贫血诊断技术
NY/T 1187—2019

* * *

中国农业出版社出版
(北京市朝阳区麦子店街18号楼)

(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)

北京印刷一厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

* * *

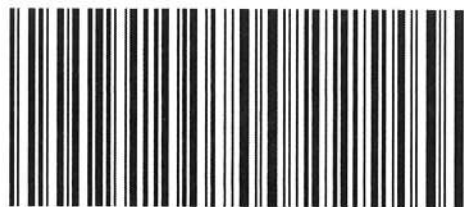
开本 880mm×1230mm 1/16 印张 1 字数 20 千字

2019年10月第1版 2019年10月北京第1次印刷

书号: 16109·4869

定价: 24.00 元

版权专有 侵权必究
举报电话: (010) 59194261



NY/T 1187—2019