

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 3790—2020

塞内卡病毒感染诊断技术

Diagnostic techniques for seneca virus A infection

2020-11-12 发布

2021-04-01 实施



中华人民共和国农业农村部发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 临床诊断	1
3.1 易感动物	1
3.2 临床症状	1
3.3 病理变化	1
3.4 结果判定	1
4 实验室诊断样品采集	1
4.1 器材	1
4.2 样品采集	1
5 病毒分离	2
5.1 器材	2
5.2 试剂	2
5.3 样品处理	2
5.4 细胞分离病毒	2
6 实时荧光反转录聚合酶链式反应(RT-qPCR)	3
6.1 引物及探针	3
6.2 器材	3
6.3 试剂	3
6.4 样本采集与处理	3
6.5 操作方法	4
6.6 试验成立条件	4
6.7 实时定量 RT-qPCR 结果判定	4
7 病毒中和试验(VNT)	4
7.1 材料准备	4
7.2 仪器及设备	5
7.3 血清样本的处理	5
7.4 操作步骤	5
7.5 结果分析	6
8 间接酶联免疫吸附试验(间接 ELISA)	6
8.1 材料准备	6
8.2 仪器及设备	6
8.3 血清样本的处理	7
8.4 操作方法	7
8.5 结果分析	7
9 综合判定	8
10 注意事项	8
附录 A(规范性附录) 溶液配制	9
附录 B(规范性附录) 病毒核酸提取	11
附录 C(规范性附录) 塞内卡病毒 VP2 蛋白的表达与纯化	12

前　　言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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:中国农业科学院兰州兽医研究所、中国动物卫生与流行病学中心。

本标准起草人:郑海学、田宏、杨帆、石正旺、尼博、朱紫祥、张克山、李丹、罗俊聪、郭建宏、何继军、党文、靳野、刘华南、茹毅、曹伟军、刘永杰、张志、吴发兴、李晓成、刘湘涛。

塞内卡病毒感染诊断技术

1 范围

本标准规定了塞内卡病毒感染的临床诊断、病毒分离、实时定量反转录聚合酶链式反应、病毒中和试验(VNT)和间接酶联免疫吸附试验的技术要求。

本标准适用于塞内卡病毒感染的诊断、检疫、检测、监测和流行病学调查等。

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 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 临床诊断

3.1 易感动物

主要感染猪,对不同年龄阶段的猪均感染,但成年猪和母猪临床特征更典型。

3.2 临床症状

3.2.1 易感动物卧地不起或跛行,偶伴有嗜睡、腹泻和发热。

3.2.2 易感动物唇部、舌面、肉眼、鼻镜、蹄踵、蹄叉等部位出现水泡。

3.2.3 发病后期,水泡破溃,结痂,严重者蹄壳脱落,恢复期可见嫩蹄,新生蹄甲。

3.2.4 新生仔猪体态虚弱,嗜睡,不愿吸乳,有时会出现急性死亡。

3.3 病理变化

特异性病理变化尚不清楚。

3.4 结果判定

易感动物出现上述临床症状和病理变化,可判定为疑似塞内卡病毒感染。确诊应采集有临床症状动物的水泡皮、水泡液,也可采集未见明显临床症状易感动物的血清或组织样品进行实验室诊断。

4 实验室诊断样品采集

4.1 器材

4.1.1 手术剪刀和镊子。

4.1.2 样品保存管。

4.1.3 离心管(2 mL、10 mL)。

4.1.4 防水标签。

4.1.5 医用防护服。

4.1.6 组织匀浆器。

4.1.7 高速组织匀浆机。

4.2 样品采集

4.2.1 水泡液采集

典型临床发病动物水泡液用灭菌注射器吸入后装入样品保存管,加青霉素1 000 IU/mL、链霉素500

IU/mL, 加盖封口, 冷冻保存。

4.2.2 水泡皮采集

用 0.01 mol/L PBS(pH 7.4) 清洗水泡皮表面, 然后用灭菌手术剪刀剪取水泡皮, 以 2 g~5 g 为宜。采集到的水泡皮, 装入样品保存管, 加 50% 甘油-PBS 保存液, 使保存液液面没过样品, 加盖封口, 冷冻保存。

4.2.3 组织样品采集

若采集不到典型的水泡皮, 则采集病灶周围破溃组织 2 g~5 g, 装入样品保存管, 加 50% 甘油-PBS 保存液, 使保存液液面没过样品, 加盖封口, 冷冻保存。临床表现健康, 但需做塞内卡病毒感染病原学检测的动物, 可在屠宰时采集淋巴结、扁桃体。对肉品进行塞内卡病毒感染病原学检测时, 可采集骨骼肌, 组织样品应不少于 2 g, 装入样品保存管中, 密封, 冷冻保存。

5 病毒分离

5.1 器材

- 5.1.1 倒置显微镜。
- 5.1.2 冰箱(2℃~8℃、-20℃、-70℃等不同温度)。
- 5.1.3 恒温培养箱。
- 5.1.4 4℃离心机。
- 5.1.5 微量移液器(10 μL~100 μL; 100 μL~1 000 μL)。
- 5.1.6 25 cm²细胞培养瓶。

5.2 试剂

- 5.2.1 0.01 mol/L pH 7.4 PBS, 配制见附录 A 中的 A.1。
- 5.2.2 细胞培养液, 配制见 A.2。
- 5.2.3 细胞维持液, 配制见 A.3。

5.3 样品处理

5.3.1 在无菌环境中, 将采集的动物机体组织(如鼻、蹄部水泡皮)置于组织匀浆器中充分研磨。加入青霉素 1 000 IU/mL、链霉素 500 IU/mL, 加 0.01 mol/L PBS(pH 7.4) 制成 1:5 的组织悬液, 4℃浸毒过夜。翌日以 3 000 r/min 4℃ 离心 10 min, 取上清液备用。

5.3.2 水泡液不经过研磨处理, 以 3 000 r/min 4℃ 离心 10 min, 取上清液备用。

5.4 细胞分离病毒

5.4.1 制备单层细胞

按常规方法将继代细胞系(BHK-21)分装在 25 cm² 细胞培养瓶中, 每瓶分装细胞悬液 5 mL, 细胞浓度为 $2 \times 10^5 / \text{mL} \sim 3 \times 10^5 / \text{mL}$, 37℃ 静置培养 48 h。

5.4.2 接种细胞

浸毒过夜后的组织悬液或水泡液上清液接种细胞。每份样品接种 2 瓶~4 瓶细胞, 另设细胞对照 2 瓶~4 瓶。接种前, 先倒去细胞培养瓶中的营养液, 加入 1 mL 已经处理好的病料液, 37℃ 静置 30 min。然后再加 4 mL 细胞维持液(pH 7.6~7.8)。细胞对照瓶不接种样品, 倒去营养液后加 5 mL 细胞维持液, 37℃ 静置培养。

5.4.3 观察和记录

通常在接种 1 d~2 d 后可出现 CPE, 主要呈现细胞圆缩、溶解脱落。对照应细胞单层完好, 细胞形态基本正常或稍有衰老。收获细胞液, 置于 -70℃ 保存。

5.4.4 盲传

如接种细胞第 1 代 72 h 后未出现 CPE, 收获细胞/病毒液按 5.4.2 所述方法再接种生长 48 h 单层细胞进行盲传, 即 1 mL 第 1 代细胞/病毒液加 4 mL 细胞维持液, 37℃ 培养。

5.4.5 结果判定

5.4.5.1 细胞病变结果观察。正常细胞对照均形态良好,接种病毒液的细胞出现细胞圆缩、溶解脱落等,说明细胞出现CPE现象。

5.4.5.2 RT-qPCR 鉴定:核酸提取见附录B。RT-qPCR 方法见第6章。

5.4.5.3 综合5.4.5.1和5.4.5.2结果,当细胞出现典型CPE,并且RT-qPCR 出现特异性扩增曲线则病毒分离成功。

6 实时荧光反转录聚合酶链式反应(RT-qPCR)

6.1 引物及探针

6.1.1 正向引物:5'-GGCCGCCACGCTATCTAACCAA-3'。

6.1.2 反向引物:5'-CACGGGCCGAGCTTCPTCAAC-3'。

6.1.3 探针引物:5'-FAM-CTTCAGTGAAAGCTCTCTGGGCCTGCATTTCCTCT-BHQ1-3'。

6.2 器材

6.2.1 荧光定量PCR仪。

6.2.2 4℃高速离心机。

6.2.3 微量移液器及配套吸头(0.5 μL~10 μL~100 μL~1000 μL)。

6.2.4 焦碳酸二乙酯(DEPC)水处理的离心管与吸头。

6.2.5 PCR扩增管。

6.3 试剂

6.3.1 总RNA提取试剂

6.3.1.1 变性液:6 mol/L 异硫氰酸胍或 Trizol Reagent。

6.3.1.2 2 mol/L 乙酸钠(pH 4.0)。

6.3.1.3 酚氯仿抽提液:苯酚-二氯甲烷-异戊醇(25:24:1)混合液。

6.3.1.4 异丙醇(分析纯)。

6.3.1.5 75%乙醇:无水乙醇(分析纯)与DEPC水按3:1配制而成。

6.3.1.6 DEPC水:将焦碳酸二乙酯按0.1%含量加入双蒸馏水(ddH₂O)中配制而成。

6.3.2 RT-PCR试剂

6.3.2.1 10×One Step RNA PCR缓冲液。

6.3.2.2 逆转录酶(AMV):5 U/μL。

6.3.2.3 核糖核酸酶抑制剂(RNase inhibitor):40 U/μL。

6.3.2.4 AMV-Optimized Taq:5 U/μL。

6.3.2.5 dNTP Mixture:包括dATP,dTTP,dCTP,dGTP,各10 mmol/L。

6.3.2.6 MgCl₂:25 mmol/L。

6.4 样本采集与处理

6.4.1 样品选择

用于病原鉴定的组织样品以临床发病动物(猪)未破裂的蹄部、鼻部等的水泡皮和水泡液为宜。对临床健康但怀疑带毒的动物可在屠宰过程中采集扁桃体、淋巴结等组织作为检测样品进行病毒核酸检测。

6.4.2 发患病料的采集和保存

参见4.2。

6.4.3 样品准备

6.4.3.1 在无菌环境中,将采集的动物机体组织(如鼻、蹄水泡皮)置于组织匀浆器中充分研磨,其他机体

组织(如淋巴结、扁桃体等)除去包膜和结缔组织,选取内部实质部分,置于组织匀浆器中充分研磨。加入青霉素 1 000 IU/mL、链霉素 500 IU/mL,加 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)制成 1:5 的组织悬液,4℃浸毒过夜。翌日以 3 000 r/min 4℃离心 10 min,取上清液备用。

6.4.3.2 水泡液不经过研磨处理,以 3 000 r/min 4℃离心 10 min,取上清液备用。

6.5 操作方法

6.5.1 核酸提取

见附录 B。

6.5.2 实时定量 RT-qPCR 反应体系

6.5.2.1 为每个样品准备 RT-qPCR 混合物。以为待检的批量样品整批准备扩增预混合体系为宜。

6.5.2.2 扩增预混合体系为:

2×One RT-PCR Buffer III	12.5 μL
Ex Taq HS (5 U/μL)	1 μL
PrimeScript RT Enzyme Mix II	1 μL
PCR 正向引物(10 μmol/L)	1 μL
PCR 反向引物 Reverse Primer(10 μmol/L)	1 μL
探针(5 μmol/L)	1 μL
总 RNA	2 μL
DEPC 水	5.5 μL
总体积	25 μL

在合适的离心机中旋转平板或 PCR 管 1 min,混匀每孔内容物。

6.5.2.3 将 PCR 管放在荧光定量 PCR 仪器上进行 RT-qPCR 扩增,程序如下:50℃ 10 min;95℃ 10 s,62℃ 30 s,72℃ 30 s,5 次循环;95℃ 10 s,60℃ 30 s(此步采集荧光),40 次循环。

6.6 试验成立条件

6.6.1 阳性对照扩增曲线有明显对数扩增曲线,且 C_t 值 $\leqslant 25$ 。

6.6.2 阴性对照扩增曲线应为基准线下的水平线。

6.7 实时定量 RT-qPCR 结果判定

若样本曲线呈 S 形曲线,且 C_t 值小于等于 35 为阳性; C_t 值大于 35 为阴性。

7 病毒中和试验(VNT)

7.1 材料准备

7.1.1 塞内卡病毒

SVA 适应于 BHK-21 单层细胞,收获的病毒液测定 TCID₅₀后,分装于小管,−70℃保存备用。

7.1.2 阳性对照血清

由分离的塞内卡病毒灭活后免疫猪制备,经病毒中和试验检测为 SVA 抗体阳性,血清效价不低于 1:512。

7.1.3 阴性对照血清

未感染塞内卡病毒的健康猪血清,经间接 ELISA 检测为 SVA 抗体阴性,血清效价不高于 1:8。

7.1.4 待检血清

待检血清经 56℃水浴灭活 30 min。

7.1.5 细胞

BHK-21 传代细胞。

7.1.6 PBS 配制

见 A.1。

7.1.7 细胞分散液

PBS 加 0.25% 胰酶, pH 7.4~7.6, 分散细胞用。配制见 A.10。

7.1.8 细胞培养液与细胞维持液

7.1.8.1 Eagle's-MEM; 配制见 A.11。

7.1.8.2 0.5% 水解蛋白/Earle's 液; 配制见 A.12。

7.1.8.3 细胞维持液: Eagle's MEM 与含 5% 水解蛋白的 Earle's 液等量混合配成, pH 7.6~7.8, 在中和试验中作稀释液用。配制见 A.3。

7.1.8.4 细胞营养液: 细胞维持液加 10% 胎牛血清(pH 7.4), 培养细胞用。配制见 A.2。

7.2 仪器及设备

7.2.1 恒温 CO₂细胞培养箱。

7.2.2 倒置显微镜。

7.2.3 冰箱(4℃和-20℃冰箱保存血清, -70℃保存病毒)。

7.2.4 4℃离心机。

7.2.5 25 cm² 和 75 cm² 细胞培养瓶。

7.2.6 96 孔细胞培养板。

7.2.7 单道可调移液器、多道可调移液器及配套吸头(20 μL~200 μL, 100 μL~1 000 μL)。

7.2.8 电动移液器及配套吸管(1 mL~10 mL)。

7.2.9 1.5 mL 离心管。

7.2.10 一次性注射器。

7.3 血清样本的处理

7.3.1 血清样本的采集与处理

静脉采血, 每头猪使用一个注射器, 采血量不少于 2 mL。将血液置于 15℃~25℃ 静置 2 h, 待其自然凝固后, 2℃~8℃ 冰箱中静置 2 h 以上, 4 000 r/min 离心 10 min。用移液器小心吸出上层血清。

7.3.2 血清样本的储存与运输

1 周以内检测的血清样本可置于 2℃~8℃ 冰箱中保存, 保存时间超过 1 周的样本应置于-20℃以下冷冻保存。低温运送并及时送达, 以确保血清样本有效。

7.4 操作步骤

7.4.1 SVA TCID₅₀ 测定

将 SVA 病毒液在 96 孔培养板上作 10 倍连续稀释, 即 10⁻¹、10⁻²、10⁻³……10⁻¹¹, 每孔 50 μL 病毒液, 100 μL 细胞悬液(细胞悬液的浓度以在 24 h 内长满单层为度, 一般每毫升 100 万个~150 万个细胞), 每个稀释度 8 孔。每块板的最后一列设 8 孔细胞对照, 每孔补加 50 μL 稀释液(不加病毒)。置于 37℃ 5% CO₂温箱培养。适时观察 CPE, 72 h 后将板固定, 并作常规染色(先用 10% 福尔马林固定 30 min, 然后置于用 10% 福尔马林配制的 0.05% 亚甲基蓝溶液中浸泡染色 30 min, 最后将培养板用水冲洗)。未病变细胞呈蓝色, 病变细胞脱落或不着色。依据 CPE 情况, 按 Reed-Muench 法计算病毒 TCID₅₀。

7.4.2 血清稀释

用细胞维持液将待检血清在培养板上从 1:4 开始作 2 倍连续稀释, 每份血清至少平行稀释 2 排孔, 每孔 50 μL。

7.4.3 中和反应

在上述每孔中加入 50 μL 含 100 TCID₅₀ 的病毒液, 封闭培养板, 37℃ 孵育 1 h。

7.4.4 对照设立

每次试验每块培养板都应设立下列对照。阳性和阴性对照血清: 阳性和阴性对照血清各设 2 孔~4 孔, 每孔加 50 μL; 正常细胞对照: 每块培养板上均设立 2 孔~4 孔不接种病毒和血清的正常细胞对照, 每

孔加入 50 μL ; 病毒对照: 每 50 μL 含 100 TCID₅₀ 的病毒液, 设 2 孔~4 孔, 每孔加入 50 μL 。

7.4.5 加入细胞

血清与病毒中和 1 h 后, 取出, 每孔加入 50 μL 细胞悬液(细胞悬液的浓度以在 24 h 内长满单层为度, 每毫升 100 万个~150 万个细胞), 置于 37°C 5% CO₂温箱培养。对照孔体积不足 150 μL 时, 用稀释液补全体积。

7.5 结果分析

7.5.1 试验成立条件

正常细胞对照在整个试验中一直保持良好的生长形态, 染色呈蓝色; 阳性对照孔(病毒被中和)无 CPE 出现, 染色呈蓝色; 阴性对照孔(病毒未被中和)出现 CPE, 染色不着色; 病毒对照无细胞生长(或可见少量病变细胞留存)。4 个对照都成立时, 试验有效; 否则, 重新试验。

7.5.2 结果判定

7.5.2.1 被检血清孔出现 100% CPE 判阴性, 50% 以上细胞保护则为阳性。

7.5.2.2 当被检血清(在血清/病毒混合物中)最终滴度大于等于 1:45 为塞内卡病毒抗体阳性; 低于 1:16 为塞内卡病毒抗体阴性; 最终滴度在(1:16)~(1:45)之间为可疑, 需要再次采样检测(重复试验), 再次试验滴度大于等于 1:16 为塞内卡病毒抗体阳性。

8 间接酶联免疫吸附试验(间接 ELISA)

8.1 材料准备

8.1.1 塞内卡病毒 VP2 蛋白

VP2 蛋白的表达与纯化见附录 C。

8.1.2 辣根过氧化物酶标记兔抗猪 IgG

试验前, 用样品稀释液作 1:20 000 稀释。

8.1.3 阳性对照血清

由分离的塞内卡病毒灭活后免疫猪制备, 经病毒中和试验检测为 SVA 抗体阳性, 血清效价不低于 1:512。

8.1.4 阴性对照血清

未感染塞内卡病毒的健康猪血清, 经间接 ELISA 检测为 SVA 抗体阴性, 血清效价不高于 1:8。

8.1.5 包被液

配制见 A.4。

8.1.6 PBS

配制见 A.1。

8.1.7 洗涤液

配制见 A.5。

8.1.8 封闭液

配制见 A.6。

8.1.9 稀释液

配制见 A.7。

8.1.10 底物溶液

配制见 A.8。

8.1.11 终止液

配制见 A.9。

8.2 仪器及设备

8.2.1 酶标测定仪。

8.2.2 恒温培养箱。

8.2.3 微量移液器及配套吸头(20 μL~200 μL; 100 μL~1 000 μL)。

8.2.4 酶标板。

8.2.5 1.5 mL 离心管。

8.2.6 一次性注射器。

8.2.7 稀释槽。

8.3 血清样本的处理

8.3.1 血清样本的采集和处理

静脉采血,每头猪使用一个注射器,采血量不少于2 mL。将血液置于室温(15℃~25℃)静置2 h。待其自然凝固后,2℃~8℃冰箱中静置2 h以上,4 000 r/min 离心10 min。用移液器小心吸出上层血清。

8.3.2 血清样本的储存与运输

1周以内检测的血清样本可置于2℃~8℃冰箱中保存,保存时间超过1周的样本应置于-20℃以下冷冻保存。低温运送并及时送达,以确保血清样本有效。

8.4 操作方法

8.4.1 SVA 重组 VP2 抗原包被

取96孔微量反应板,每孔加入用包被缓冲液稀释至工作浓度的SVA 重组 VP2 抗原50 μL(5 μg/mL),置于4℃过夜。

8.4.2 洗板

弃去板中包被液,每孔加入220 μL洗涤液,重复洗3次。甩掉洗涤液,并在吸水纸上拍干残留液体。

8.4.3 加封闭液

每孔加入封闭液120 μL,置于37℃恒温箱内2 h。封闭结束后,弃去板中的封闭液,于吸水纸上拍干后,置于4℃保存备用。

8.4.4 加待检血清、阳性对照血清及阴性对照血清

将待检血清、阳性对照血清及阴性对照血清用稀释液分别作1:30稀释,每孔加入100 μL。每个待检样品及对照血清作两孔重复,置于37℃温箱内反应30 min。取出反应板,弃去反应液,洗板同8.4.2。

8.4.5 加酶标抗体

将兔抗猪IgG-辣根过氧化物酶用样品稀释液作1:20 000稀释至工作浓度,每孔加入50 μL。置于37℃温箱内反应30 min。取出反应板,弃去反应液,洗板同8.4.2。

8.4.6 加底物溶液

每孔加入底物溶液TMB 50 μL,置于37℃温箱内避光反应15 min。

8.4.7 终止反应

每孔加入终止液50 μL,终止反应。

8.4.8 读数

在酶标测定仪上读取各孔吸光值(OD_{450 nm})。

8.5 结果分析

8.5.1 试验成立条件

在酶标测定仪上检测各孔光吸收值(OD_{450 nm}),计算阳性对照平均OD_{450 nm}和阴性对照平均OD_{450 nm}。阳性对照平均OD_{450 nm}>1.0,阴性对照平均OD_{450 nm}<0.2,试验成立。

8.5.2 结果判定

计算待检血清平均OD_{450 nm}、阳性对照孔平均OD_{450 nm}和阴性对照孔平均OD_{450 nm},求出每个样品的S/P值。当样品S/P值≥0.35时,判定为塞内卡病毒抗体阳性;当样品S/P值<0.35时,判定为塞内卡病毒抗体阴性。

9 综合判定

- 9.1 临床判定为疑似的易感动物,经第5章分离出病毒,或经第6章检出塞内卡病毒核酸,或经第7章、第8章检出塞内卡病毒抗体的;可判定为塞内卡病毒感染。
- 9.2 临床无明显特异性症状的非免疫动物经第7章或第8章检出塞内卡病毒抗体的,可判定该动物曾经感染过塞内卡病毒。
- 9.3 临床无明显特异性症状的非免疫动物经第5章或第6章任一项检出阳性的,可判定为塞内卡病毒带毒(潜伏感染)。

10 注意事项

- 10.1 所有操作应严格按照GB 19489和GB/T 27401的规定执行。
- 10.2 所有试剂需在2℃~8℃保存,使用前恢复至室温(15℃~25℃)。
- 10.3 操作时,取样、稀释准确,移液器应校准,并注意更换吸头。
- 10.4 底物溶液和终止液对眼睛、皮肤及呼吸道有刺激性作用,使用过程应注意防护,防止直接接触和吸入。
- 10.5 底物溶液应避光保存,避免与氧化剂接触。



附录 A
(规范性附录)
溶液配制

A.1 PBS(0.01 mol/L PBS, pH 7.4)

磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄ , 分析纯)	0.2 g
十二水磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O, 分析纯)	2.89 g
氯化钠(NaCl, 分析纯)	8.0 g
氯化钾(KCl, 分析纯)	0.2 g
蒸馏水加至 1 000 mL	

溶解后, 调节 pH 至 7.4, 103 kPa 高压蒸汽灭菌 30 min, 4℃保存备用。

A.2 细胞营养液(细胞培养液)

Eagle's-MEM 营养液	45 mL
0.5% 水解乳白蛋白/Earle's 液	45 mL
胎牛血清	10 mL
5% 碳酸氢钠(NaHCO ₃)调整 pH 至 7.2~7.4。	

A.3 细胞维持液

Eagle's-MEM 营养液	50 mL
0.5% 水解乳白蛋白/Eagle's 液	50 mL
5% 碳酸氢钠(NaHCO ₃)调整 pH 至 7.6~7.8。	

A.4 包被液(0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液, pH 9.6)

碳酸钠(Na ₂ CO ₃ , 分析纯)	1.59 g
碳酸氢钠(NaHCO ₃ , 分析纯)	2.93 g
蒸馏水加至 1 000 mL	
溶解后, 调节 pH 至 9.6, 4℃保存备用。	

A.5 洗涤液(含 0.01 mol/L PBS, 0.05% 吐温-20, pH 7.4)

磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄ , 分析纯)	0.2 g
十二水磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O, 分析纯)	2.89 g
氯化钠(NaCl, 分析纯)	8.0 g
氯化钾(KCl, 分析纯)	0.2 g
吐温-20	0.5 mL
蒸馏水加至 1 000 mL。	

A.6 封闭液

称取 1 g 明胶, 加入 100 mL PBST 溶液中。

A.7 稀释液

10 mL 马血清、10 mL 大肠杆菌裂解液, 加入 PBST 溶液定容至 100 mL, 混匀。

A.8 底物溶液

底物溶液 A: TMB(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, 分析纯)	200 mg
无水乙醇	100 mL
蒸馏水加至 1 000 mL。	
底物溶液 B:	
磷酸氢二钠(Na_2HPO_4 , 分析纯)	71.7 g
柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, 分析纯)	9.33 g
0.75% 过氧化氢尿素	6.4 mL
蒸馏水加至 1 000 mL, pH 调至 5.0~5.4。	

将底物溶液 A 和底物溶液 B 按 1:1 混合, 即成底物溶液, 现用现配。

A.9 终止液

硫酸(H_2SO_4 , 分析纯)	58 mL
蒸馏水	442 mL

A.10 细胞分散液(含 0.01 mol/L PBS, 0.25% 胰酶)

0.01 mol/L PBS	1 000 mL
胰酶	2.5 g
4°C 冰箱过夜, 低速搅拌, 溶解后, 调节 pH 至 7.4~7.6、过滤除菌, 分装, -20°C 或 4°C 保存备用。	

A.11 Eagle's MEM(最低限度必需氨基酸营养液)

10×Eagle's MEM 营养液: Eagle's MEM 营养剂 9.5 g, 加超纯水 100 mL。溶解后过滤除菌。用无菌超纯水将 10×营养液按 1:10 稀释, 即 100 mL 营养液中加入 900 mL 无菌超纯水中即为使用浓度营养液, 4°C 保存备用。

A.12 0.5% 水解乳白蛋白/Eagle's 液

氯化钠 (NaCl)	6.8 g
氯化钾 (KCl)	0.4 g
氯化钙 (CaCl_2)	0.3 g
硫酸镁 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.2 g
磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0.14 g
葡萄糖	1.0 g
10% 酚红	2.0 mL
水解乳白蛋白	5.0 g
加超纯水至 1 000 mL。	

按配方称取各成分并逐个溶解, 最后加超纯水至 1 000 mL, 过滤除菌。4°C 保存备用。

附录 B
(规范性附录)
病毒核酸提取

B.1 材料和试剂

Trizol、三氯甲烷、异丙醇、DEPC 及 RNA 提取试剂盒均为商品化试剂。

DEPC 水:每 100 mL 双蒸水中加入 DEPC(焦碳酸二乙酯)0.1 mL,混匀,高压灭菌。

75%乙醇:用无水乙醇和 DEPC 水配制,−20℃预冷。

B.2 方法

B.2.1 酚氯仿法抽提核酸

B.2.1.1 取待检样本、阴性对照、阳性对照各 200 μL 分别置于 1.5 mL 离心管中,每管加入 1 000 μL 裂解液,反复混匀,冰上放置 5 min。

B.2.1.2 每管分别加入 200 μL 三氯甲烷,小心盖上管盖,离心混匀,室温放置 5 min。4℃ 12 000 r/min 离心 15 min,可见分为 3 层,上层水相含 RNA。

B.2.1.3 取相同数量的新离心管,加入 500 μL 异丙醇,吸取上清液至新离心管中,上清液的量为 500 μL ,不能吸出中间层,颠倒混匀,室温放置 15 min。

B.2.1.4 4℃ 12 000 r/min 离心 10 min,小心倒掉上清液。

B.2.1.5 加 1 000 μL 75%乙醇颠倒洗涤沉淀,4℃ 10 000 r/min 离心 5 min,小心倒掉上清液。

B.2.1.6 4℃ 10 000 r/min 离心 5 min,将管壁的残余液体甩到管底,小心吸取残余液体,室温干燥 5 min~10 min。

B.2.1.7 每管加 10 μL DEPC 水,用于溶解 RNA。提取的 RNA 即可用于 PCR 扩增,也可于−70℃以下冰箱中储存备用。

B.2.2 核酸提取等效方法

塞内卡病毒核酸提取液可以采用等效 RNA 提取试剂和方法,如采用自动化核酸提取仪和配套核酸抽提试剂进行核酸提取。

附录 C
(规范性附录)
塞内卡病毒 VP2 蛋白的表达与纯化

C.1 材料和试剂

塞内卡病毒 CH-FJ-2017 株为中国农业科学院兰州兽医研究所分离培养,大肠杆菌 JM109 和 BL21 (DE3)、pET-28a 载体、RNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒、反转录试剂盒、胶回收试剂盒、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、蛋白纯化试剂盒,培养基均为商品化试剂。

C.2 引物序列

上游引物: 5'-CGGGATCCATGGATCACAAATACCGAAGAAA-3';

下游引物: 5'-CGGAATCTGCTCTCCGCCGTCGCCGGTC-3'.

C.3 方法

C.3.1 VP2 重组蛋白原核表达载体的构建

将塞内卡病毒 CH-FJ-2017 株接种 BHK-21 细胞,在 5% CO₂, 37℃ 的条件下培养 12 h~24 h。当 70% 的细胞出现病变时,收集细胞培养物,反复冻融 3 次。利用 RNA 提取试剂盒提取病毒的 RNA,并反转录成 cDNA。用上下游引物扩增 VP2 基因,琼脂糖凝胶电泳并纯化回收相应的扩增片段,片段大小为 650 bp。纯化产物与原核表达载体 pET-28a 分别用限制性内切酶 BamH I 和 EcoR I 在 37℃ 双酶切 2 h。回收目的基因 VP2 和 pET-28a 载体片段,用 T4 DNA 连接酶 4℃ 连接过夜。转化大肠杆菌感受态细胞 JM109,筛选获得阳性重组质粒,命名为 pET-28a(+)。重组质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞,获得阳性菌株。

C.3.2 VP2 重组蛋白的表达与纯化

将 2 mL 的阳性菌液加入 100 mL 含 Amp 的 LB 液体培养基中,37℃ 振荡培养至 OD_{600 nm} 达到 0.6~0.8 时,加入终浓度 0.5 mmol/L 的 IPTG,28℃ 低温诱导 12 h 后,5 000 r/min 离心 5 min,收集菌体沉淀。菌体沉淀用 PBS 洗 3 遍,超声裂解,12 000 r/min 4℃ 离心 10 min,收集上清液。上清液经 GST Bind 树脂纯化,分步洗脱并收集目的蛋白洗脱液,即为纯化的目标蛋白。

C.3.3 重组蛋白的纯度及浓度测定

分别取 5 μL、2.5 μL 和 1 μL 纯化的重组蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,用凝胶成像仪成像并用薄层扫描法测定蛋白纯度,蛋白纯度应 ≥90%。同时利用 BCA 法测定蛋白浓度,具体过程参见说明书,纯化后蛋白浓度应 ≥0.2 mg/mL。

NY/T 3790—2020

中华人民共和国
农业行业标准
塞内卡病毒感染诊断技术

NY/T 3790—2020

* * *

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 1.25 字数 25 千字

2021 年 3 月第 1 版 2021 年 3 月北京第 1 次印刷

书号: 16109 · 8474

定价: 40.00 元

版权专有 侵权必究
举报电话: (010) 59194261



NY/T 3790—2020