

ICS 11.220
CCS B 41

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4041—2021

水貂阿留申病诊断技术

Diagnostic techniques for aleutian mink disease

2021-12-15 发布

2022-06-01 实施



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 临床诊断	1
5.1 临床症状	1
5.2 病理诊断	1
5.3 结果判定	1
6 PCR 检测	2
6.1 仪器	2
6.2 试剂	2
6.3 AMDV 阴性对照和阳性对照样品的制备	2
6.4 样品的采集和处理	2
6.5 操作方法	2
6.6 质控标准	3
6.7 结果判定	3
7 实时定量 PCR 检测	3
7.1 仪器	3
7.2 试剂	3
7.3 AMDV 阴性对照和阳性对照样品的制备	3
7.4 样品采集和处理	3
7.5 操作方法	3
7.6 质控标准	4
7.7 结果判定	4
8 CIEP 检测	4
8.1 仪器	4
8.2 耗材	4
8.3 试剂	4
8.4 阴性对照和阳性对照样品的制备	4
8.5 样品采集和处理	4
8.6 操作方法	4
8.7 质控标准	5
8.8 结果判定	5
9 ELISA 检测	5
9.1 仪器	5
9.2 试剂	5
9.3 包被抗原	5
9.4 阴性对照和阳性对照样品的制备	5

9.5	样品采集和处理	5
9.6	操作方法	6
9.7	质控标准	6
9.8	结果判定	6
10	综合判定	6
附录 A(资料性)	AMDV PCR 检测引物、溶液的配制、电泳示意图及扩增产物序列	7
附录 B(资料性)	实时定量 PCR 扩增引物、探针和扩增序列	9
附录 C(资料性)	CIEP 实验溶液的配制、打孔模型图及电泳结果图示	10
附录 D(资料性)	ELISA 实验溶液配制	12

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：中国农业科学院特产研究所、中国农业科学院哈尔滨兽医研究所、佛山科学技术学院、长春海关、哈尔滨国生生物科技股份有限公司、中国兽医药品监察所、青岛农业大学。

本文件主要起草人：张蕾、刘昊、陆涛峰、张海玲、程悦宁、赵传芳、王伟利、胡博、朱言柱、邓效禹、闫喜军、廉士珍、王振军、董明奇、曲会、陈洪岩、徐磊、印春生、孟庆峰、单虎、杨瑞梅。

引 言

水貂阿留申病(Aleutian mink disease)又称浆细胞增多症或高 γ 球蛋白血症,是由水貂阿留申病毒(Aleutian mink disease virus, AMDV)引起水貂(*Neovison vison*)的一种免疫抑制性疾病。幼貂感染后可急性死亡,成年水貂感染后多呈慢性经过,患病水貂进行性消瘦,毛皮质量差,繁殖能力下降。该病在世界各水貂养殖国家广泛流行。

水貂阿留申病诊断技术

1 范围

本文件规定了水貂阿留申病的临床诊断、PCR 检测、实时定量 PCR 检测、对流免疫电泳和 ELISA 检测的操作方法和技术要求。

本文件适用于水貂阿留申病的诊断、检疫、监测和流行病学调查。

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）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和实验方法

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。

AMDV: 水貂阿留申病病毒 (Aleutian mink disease virus)

CIEP: 对流免疫电泳 (Counter-immunoelectrophoresis)

CRFK: 猫肾细胞 (Crandell rees feline kidney)

Ct: 每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数 (Cycle threshold)

ELISA: 酶联免疫吸附实验 (Enzyme-linked immunosorbent assay)

OD: 光密度 (Optical density)

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

5 临床诊断

5.1 临床症状

5.1.1 幼貂常呈急性经过，病程短促，腹式呼吸，突然死亡。

5.1.2 成年水貂常呈慢性经过，进行性消瘦，渴欲猛增，暴饮，厌食。公貂性欲下降或死精、少精、产生畸形精子。母貂不孕或流产，仔貂成活率低。

5.1.3 个别水貂表现出神经症状，痉挛、步态蹒跚、共济失调或后肢麻痹等。

5.2 病理诊断

5.2.1 尸体消瘦、贫血，内脏出血。

5.2.2 幼貂肺水肿。肺泡间质增厚、出血，肺泡Ⅱ型细胞内可见包涵体。

5.2.3 成年水貂肾、脾肿大。肝、脾、肾等多个组织内均可见血管周围浆细胞浸润。

5.2.4 怀孕期可见死胎、木乃伊胎、子宫出血。

5.3 结果判定

本病多呈隐性感染，临床症状进程缓慢且不典型，易与其他疾病相混淆。根据临床症状或病理诊断可做出初步诊断，确诊须通过实验室进行。

6 PCR 检测

6.1 仪器

- 6.1.1 微量移液器(0.5 μL ~10 μL 、2 μL ~20 μL 、20 μL ~200 μL)及其配套吸头。
- 6.1.2 小型台式离心机(最大离心力在 12 000 r/min 以上)。
- 6.1.3 涡旋混匀器。
- 6.1.4 PCR 扩增仪及与其配套的 PCR 管。
- 6.1.5 电泳仪。
- 6.1.6 电泳槽。
- 6.1.7 紫外线凝胶成像仪。

6.2 试剂

- 6.2.1 除特别说明外,本文件所用试剂均为分析纯,实验用水符合 GB/T 6682 的规定。
- 6.2.2 非结构蛋白 NS1 基因保守区引物(浓度为 10 pmol/ μL ,见附录 A 中的 A.1)。
- 6.2.3 *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μL)及配套的 10 \times PCR 缓冲液。
- 6.2.4 dNTP(2.5 mmol/L)。
- 6.2.5 DL2000 DNA Marker。
- 6.2.6 1 \times TAE 电泳缓冲液(见 A.2.1)。
- 6.2.7 商品化无毒核酸染料。
- 6.2.8 6 \times 核酸电泳上样缓冲液。
- 6.2.9 1%琼脂糖凝胶(见 A.2.2)。

6.3 AMDV 阴性对照和阳性对照样品的制备

CRFK 传代细胞培养物,反复冻融 2 次~3 次,5 000 r/min 离心 10 min,取上清液作为阴性对照样品。国际参考毒株 AMDV-G CRFK 传代细胞培养物反复冻融 2 次~3 次,煮沸后 5 000 r/min 离心 10 min,取上清液作为阳性对照样品。

6.4 样品的采集和处理

患病动物的脾、肾和血液按 NY/T 541 的规定执行。

6.5 操作方法

6.5.1 DNA 提取

按照商品化的 DNA 抽提试剂盒按操作说明提取组织或血液中的病毒 DNA。

6.5.2 PCR 反应体系

在 0.2 mL PCR 管中依次加入以下试剂:

10 \times PCR 缓冲液	2.5 μL
dNTP(2.5 mmol/L)	2.0 μL
正向引物 (10 pmol/ μL)	1.0 μL
反向引物 (10 pmol/ μL)	1.0 μL
模板 DNA(10 ng/ μL ~100 ng/ μL)	1.0 μL
<i>Taq</i> DNA 聚合酶	0.5 μL
灭菌蒸馏水	17.0 μL

同时设阴性对照及阳性对照。总体系为 25 μL ,用涡旋混匀器进行混匀,瞬间离心 10 s 备用。

6.5.3 扩增程序

将 PCR 反应管置于 PCR 扩增仪按如下程序扩增:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,35 个循环(94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s),最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。

6.5.4 PCR产物电泳检测

- 6.5.4.1 用1×TAE电泳缓冲液配制1%琼脂糖凝胶溶液100 mL,加热使琼脂糖溶解。
- 6.5.4.2 冷却至50℃~60℃,按操作说明加入无毒核酸染料,充分混匀后制备琼脂糖平板。
- 6.5.4.3 将冷却凝固的平板放入水平电泳槽中,加入1×TAE电泳缓冲液至刚好高出凝胶表面。
- 6.5.4.4 吸取每个PCR扩增产物5 μL与1 μL 6×上样缓冲液混合,加入样品孔中,取5 μL DL2000 DNA Marker分子量标准加入对照孔内。
- 6.5.4.5 100 V恒压电泳30 min,当溴酚蓝达到琼脂糖凝胶底部时停止电泳,用紫外凝胶成像仪观察结果。

6.6 质控标准

阳性对照出现一条大小为374 bp的特异性扩增条带(见A.3),阴性对照无此特异性条带,满足以上两个条件,则实验成立。

6.7 结果判定

- 6.7.1 若以被检样品提取的DNA为模板扩增出大小为374 bp特异性扩增条带,测序结果与参考序列(见A.4)的同源性大于85%,则判定被检样品AMDV核酸阳性。
- 6.7.2 若以被检样品提取的DNA为模板未扩增出374 bp特异性扩增条带,则判定被检样品AMDV核酸阴性。
- 6.7.3 若出现与设计长度不同的条带,为非特异性反应,需重复实验,2次实验均为非特异性条带时,可判定为阴性。

7 实时定量PCR检测

7.1 仪器

- 7.1.1 微量移液器(0.5 μL~10 μL,2 μL~20 μL,20 μL~200 μL)及其配套吸头。
- 7.1.2 荧光定量PCR检测仪及其配套的0.2 mL荧光定量PCR管。
- 7.1.3 涡旋混匀器。

7.2 试剂

- 7.2.1 除特别说明外,本文件所用试剂均为分析纯,实验用水符合GB/T 5682的规定。
- 7.2.2 2×Premix Ex Taq™反应预混液。
- 7.2.3 引物及TaqMan探针及扩增序列(见附录B)。

7.3 AMDV阴性对照和阳性对照样品的制备

同6.3。

7.4 样品采集和处理

同6.4。

7.5 操作方法

7.5.1 DNA提取

同6.5.1所述方法提取阳性对照、阴性对照和样品DNA。

7.5.2 实时定量PCR反应体系

按体积由大到小顺序在实时定量PCR管中加入试剂,总体积为20 μL,用涡旋混匀器进行混匀,瞬时离心,备用。实时定量PCR反应体系:

2×Premix Ex Taq™(Probe qPCR)	10.0 μL
正向引物(10 pmol/μL)	0.8 μL
反向引物(10 pmol/μL)	0.8 μL
TaqMan探针	0.2 μL

DNA 模板(101 copies/ μL ~107 copies/ μL) 1.0 μL

灭菌蒸馏水 7.2 μL

7.5.3 实时定量 PCR 反应参数

将加好样品的 PCR 管放入实时定量 PCR 仪内,记录样品摆放顺序。反应参数设置:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 s,40 个循环(95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s),反应结束后检测荧光并记录 C_t 值。

7.6 质控标准

阳性对照的 C_t 值应 ≤ 30 ,并出现特定的扩增曲线;阴性对照应无 C_t 值且无扩增曲线。满足以上 2 个条件,则实验成立。

7.7 结果判定

7.7.1 若样品 C_t 值 ≤ 30 时,且出现特定的扩增曲线,判定样品 AMDV 核酸阳性。

7.7.2 若样品无 C_t 值或 C_t 值 > 35 时,判定样品 AMDV 核酸阴性。

7.7.3 若样品 $30 < C_t$ 值 ≤ 35 ,判定样品疑似,需重做。若 $C_t \leq 35$,且出现特定的扩增曲线,判定样品 AMDV 核酸阳性;否则,判定样品 AMDV 核酸阴性。

8 CIEP 检测

8.1 仪器

8.1.1 微量移液器(0.5 μL ~10 μL)及其配套吸头。

8.1.2 小型台式离心机(最大离心力在 12 000 r/min 以上)。

8.1.3 酒精灯。

8.1.4 电泳仪。

8.1.5 电泳槽。

8.2 耗材

8.2.1 载玻片(厚 3 mm,长 100 mm,宽 45 mm)。

8.2.2 吸管(10 mL)。

8.2.3 直径 3 mm 打孔器。

8.3 试剂

8.3.1 pH 8.6 三羟甲基氨基甲烷(Tris)-巴比妥钠缓冲液(见附录 C 中的 C.1.1)。

8.3.2 1%巴比妥琼脂糖凝胶(见 C.1.2)。

8.3.3 商品化的对流免疫电泳抗原。

8.4 阴性对照和阳性对照样品的制备

采集 AMDV 阴性的健康水貂血液分离获得血清为阴性对照;采集 AMDV 阳性水貂血液分离获得血清,CIEP 法测定抗体效价 1:80 以上为阳性对照。

8.5 样品采集和处理

同 7.3。

8.6 操作方法

8.6.1 电泳板的制备

取载玻片将其清洗干净后平放在实验台上,用 10 mL 吸管吸取已融化并冷却至 70 $^{\circ}\text{C}$ 的 1%巴比妥琼脂糖缓冲液,均匀地铺于载玻片上,待冷却凝固后备用,凝胶厚度大于 3 mm,现用现配。

8.6.2 打孔及封底

将已凝固的琼脂糖板放在孔径 3 mm、孔距 4 mm 的打孔模型图纸上,用打孔器进行打孔(见图 C.1)。待打孔完毕,将玻璃板置于酒精灯外焰上加热,使各孔底部与玻璃板之间凝固形成封膜,置于室温冷却 30 min,备用。

8.6.3 加样

将阴性样品、阳性样品和待检血清按编号顺序用移液器逐份加到靠阳极的血清孔内,每份样品更换一个移液器吸头,抗原加入电泳槽靠阴极的孔内,抗原和血清各加入 10 μ L。

8.6.4 电泳

将电泳槽两侧加入巴比妥电泳缓冲液,以接近但不超过红色刻度线为宜。将加样完毕的平板放于电泳槽架上,以双层滤纸或纱布进行搭桥,一端放在琼脂糖板的边缘,不要盖住加样孔,一端放入电泳槽内的电泳缓冲液中。接通电源,调整电压到 90 V,45 min 结束电泳,观察结果。

8.7 质控标准

取出玻璃板在阳光下或白灯下以黑色为背景观察沉淀线,判定结果。标准阳性血清和抗原孔之间有明显沉淀线(见图 C.2),标准阴性血清和抗原孔之间无沉淀线时,满足上述两个条件时,判定实验成立,否则实验不成立。

8.8 结果判定

8.8.1 若抗原孔和血清孔之间稍偏向血清孔一侧形成一条直的或弯曲的灰白色沉淀线,判定被检样品 AMDV 抗体阳性。

8.8.2 若抗原和血清孔之间无任何沉淀线,或虽在血清孔近旁出现较宽呈云雾状的弧形沉淀带,但其无可见直的灰白色沉淀线者,判定被检样品 AMDV 抗体阴性。

8.8.3 在抗原和血清孔之间出现模糊不清的沉淀线而难以判定时,可用 0.9% 氯化钠水溶液浸泡琼脂板 60 min,或放在 4 $^{\circ}$ C 湿盒内,翌日再次观察判定。若仍无法判定则应重做,重做满足阳性判定条件即判定为 AMDV 抗体阳性,不满足阳性判定条件即判定为 AMDV 抗体阴性。

9 ELISA 检测

9.1 仪器

- 9.1.1 96 孔酶标板。
- 9.1.2 恒温培养箱。
- 9.1.3 洗板机。
- 9.1.4 酶标仪(450 nm)。

9.2 试剂

- 9.2.1 包被液(见附录 D 中的 D.1)。
- 9.2.2 洗涤液(见 D.2)。
- 9.2.3 封闭液(见 D.3)。
- 9.2.4 血清稀释液(见 D.4)。
- 9.2.5 底物显色液(见 D.5)。
- 9.2.6 终止液(见 D.6)。
- 9.2.7 山羊抗貂 IgG/HRP。

9.3 包被抗原

采用固相合成法合成 AMDV 多肽抗原 TKDNCHKQIPNNKGNF,在 C 端(序列末端已加入 Cys)并与 OVA 载体蛋白相偶联。经离子交换层析和反向高效液相色谱纯化分析,纯度均达 95% 以上,冻干保存。

9.4 阴性对照和阳性对照样品的制备

阴性对照血清采集同 8.4,经 ELISA 检测 $OD_{450\text{ nm}} < 0.2$ 。阳性对照血清采集同 8.4,经 ELISA 检测 $1.0 \leq OD_{450\text{ nm}} \leq 1.7$ 。

9.5 样品采集和处理

同 6.4。

9.6 操作方法

9.6.1 包被

用包被液稀释 1 mg/mL AMDV 多肽抗原至 2 μg/孔, 每孔 100 μL, 包被 96 孔酶标板, 封口后, 4 °C 包被 12 h。包被结束后, 弃去孔内液体, 每孔加入 300 μL 洗涤液, 振荡洗涤 3 次, 每次 5 min。

9.6.2 封闭

每孔加入 300 μL 的封闭液, 置于 37 °C 恒温培养箱孵育 2 h。封闭结束后, 弃去孔内液体, 每孔加入 300 μL 洗涤液, 振荡洗涤 3 次, 每次 5 min。于吸水滤纸上拍干除去孔内残余液体。

9.6.3 加样

用血清稀释液 1 : 200 稀释待检血清, 每个样品一个重复, 每孔加入 100 μL, 同时加入阴性对照和阳性对照血清各 2 孔, 100 μL/孔, 置于 37 °C 温箱孵育 30 min。孵育结束后, 弃去孔内液体, 每孔加入 300 μL 洗涤液, 振荡洗涤 5 次, 每次 5 min。于吸水滤纸上拍干除去孔内残余液体。

9.6.4 加酶标抗体

用血清稀释液 1 : 4 000 稀释山羊抗貂 IgG/HRP, 100 μL/孔, 37 °C 温箱孵育 30 min, 洗板同 9.6.3, 每次拍干。

9.6.5 显色

每孔加入 100 μL 底物显色液, 轻轻摇匀, 25 °C 避光显色 10 min。

9.6.6 终止反应

每孔加入 100 μL 终止液终止反应。

9.6.7 读数

用酶标仪读取 OD_{450 nm} 值。

9.7 质控标准

计算阳性对照 OD_{450 nm} 平均值和阴性对照 OD_{450 nm} 平均值。阳性对照两孔平均 OD_{450 nm} 值 ≥ 1.0, 阴性对照两孔平均 OD_{450 nm} 值 < 0.2 时, 判定实验成立, 否则实验不成立。

9.8 结果判定

9.8.1 计算待测样品 S/P 值: $S/P = (\text{OD}_{450 \text{ nm}} \text{ 样品平均值} - \text{OD}_{450 \text{ nm}} \text{ 阴性对照平均值}) / (\text{OD}_{450 \text{ nm}} \text{ 阳性对照平均值} - \text{OD}_{450 \text{ nm}} \text{ 阴性对照平均值})$ 。若 $S/P \geq 0.23$, 判定为 AMDV 抗体阳性。

9.8.2 $S/P < 0.23$ 时, 判定为 AMDV 抗体阴性。

10 综合判定

10.1 符合临床症状、病理变化可判为疑似病例, 取样经 PCR 检测或实时定量 PCR 检测为阳性, 可诊断为水貂阿留申病。

10.2 符合临床症状、病理变化可判为疑似病例, 取样经 CIEP 或 ELISA 检测为阳性, 可诊断为水貂阿留申病。

附录 A

(资料性)

AMDV PCR 检测引物、溶液的配制、电泳示意图及扩增产物序列

A.1 PCR 扩增引物序列

正向引物(374F):5'-CATATTCACCTGTTGCTTAGGTTA-3';

反向引物(374R):5'-CGTTCTTTGTTAGTTAGGTTGTC-3';

扩增片段长度:374 bp。

A.2 PCR 溶液的配制

A.2.1 1×TAE 电泳缓冲液

A.2.1.1 50×TAE 储存液

三羟甲基氨基甲烷(Tris) 242 g

乙二胺四乙酸二钠(Na₂EDTA·2H₂O) 37.2 g

冰乙酸 57.1 mL

灭菌蒸馏水 800 mL

充分搅拌溶解,加灭菌蒸馏水定容至 1 L,室温保存。

A.2.1.2 1×TAE 工作液

50×TAE 储存液 10 mL

灭菌蒸馏水 490 mL

充分搅拌溶解,室温保存。

A.2.2 1% 琼脂糖凝胶

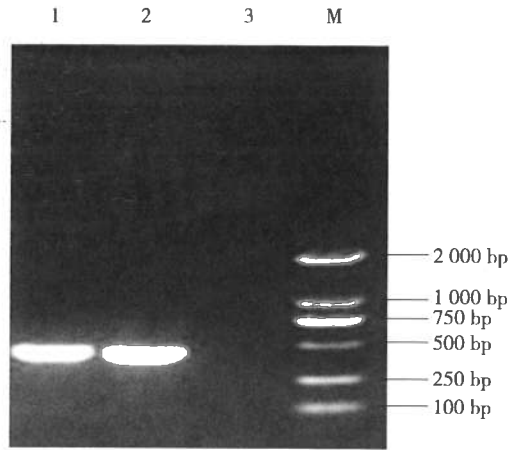
琼脂糖 1 g

1×TAE 溶液 100 mL

充分混匀后,置于微波炉中加热至凝胶完全溶化成液体。

A.3 PCR 电泳示意图

见图 A.1。



标引序号说明：
M——DL2000 DNA Marker；
1——阳性样品；
2——阳性对照；
3——阴性对照。

图 A. 1 PCR 扩增结果示意图

A. 4 AMDV PCR 扩增产物序列 374 bp(ADMV-G 株, GenBank 登录号 M20036)

5'-CATATTCACTGTTGCTTAGGTTACTTTGATAAGAATGAAGATCCTAAGGATGTTCAA
AAATCCTTAGGTTGGTTTATGAAAAGACTAAATAAAGACCTAGCAGTTATCTATAGTAACC
ATCATTGTGACATACAAGATATTAAGGATCCTGAAGATAGAGCTAAGAACCTAAAAGTGTG
GATTGAAGATGGACCTACTAAGCCTTACAAATATTTTAACAAACAAACCAACAAGACTAC
AATAAACCAAGTTCACCTTGAGAGACTATACATTCATATACCTGTTTAACAAAGATAAGATAA
ATACAGATAGTATGGATGGTACTTTGCTGCTGGTAACGGTGGCATTGTTGACAACCTAACT
AACAAAGAACG-3'

附录 B

(资料性)

实时定量 PCR 扩增引物、探针和扩增序列

B.1 实时定量 PCR 扩增引物和探针序列

正向引物(AMDV 149F):5'-CGTTACAGGTTGCTTTAGATAC-3';

反向引物(AMDV 149R):5'-AGGATATCTGTTGTAAATGTAACATGG-3';

TaqMan 探针:5'-CCGTTGGGGGAAACACTGGGCT-3';

片段长度:149 bp。

B.2 实时定量 PCR 扩增序列

5'-CGTTACAGGTTGCTTTAGATACTAACAACATACTGCCATATACTCCAGCTGCGCCGTT
GGGGAAACACTGGGCTTTGTTCTTGGAGAGCAACCAACCAACCAATATAGGTATTATC
ATCCATGTTACATTTACAACAGATATCCT-3'



附录 C
(资料性)

CIEP 实验溶液的配制、打孔模型图及电泳结果图示

C.1 CIEP 实验溶液的配制

C.1.1 三羟甲基氨基甲烷(Tris)-巴比妥钠缓冲液(pH 8.6)

巴比妥钠	10.31 g
三羟甲基氨基甲烷	6.01 g
叠氮钠	0.2 g

去灭菌蒸馏水溶解后,用盐酸将 pH 调至 8.6,定容至 1 L。

C.1.2 1%巴比妥琼脂糖凝胶

琼脂糖	1 g
巴比妥电泳缓冲液	100 mL

充分混匀后,置于微波炉中温加热至凝胶完全溶化成液体。

C.2 CIEP 实验打孔模型图

见图 C.1。

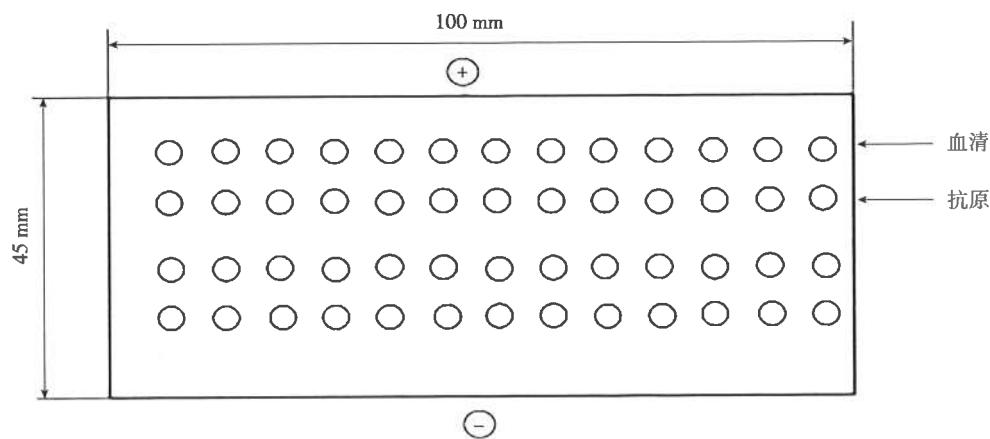
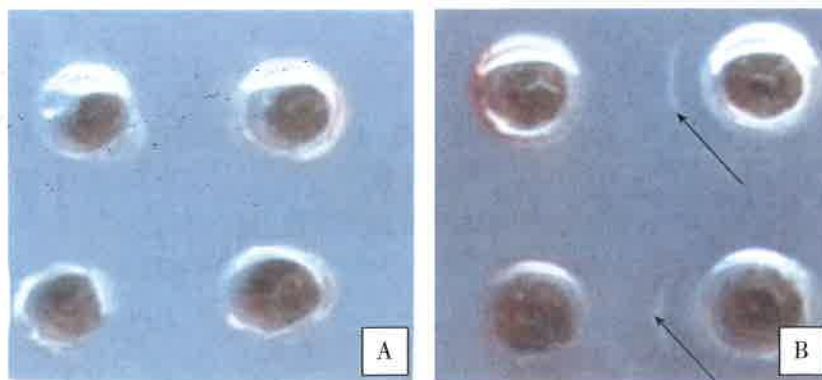


图 C.1 打孔模型图

C.3 CIEP 结果示意图

见图 C.2。



标引序号说明:

A——CIEP 阴性结果,无沉淀线;

B——CIEP 阳性结果,灰白色沉淀线。

图 C.2 CIEP 阴、阳性结果示意图

附录 D
(资料性)
ELISA 实验溶液配制

D.1 包被液(0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液, pH 9.6)

碳酸钠(Na_2CO_3 , 分析纯)	1.59 g
碳酸氢钠(NaHCO_3 , 分析纯)	2.93 g
灭菌蒸馏水	800 mL
溶解后, 调节 pH 至 9.6, 加灭菌蒸馏水定容至 1 L, 4℃ 保存备用。	

D.2 洗涤液(含 0.01 mol/L PBS, 0.05% 吐温-20, PBST, pH 7.4)

磷酸二氢钾(KH_2PO_4 , 分析纯)	0.2 g
十二水磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	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
灭菌蒸馏水	800 mL
溶解后, 调节 pH 至 7.4, 加灭菌蒸馏水定容至 1 L, 4℃ 保存备用。	

D.3 封闭液(5%的脱脂乳的 PBST)

称取 5 g 脱脂乳, 加入 100 mL 的 PBST 溶液中, 现用现配。

D.4 稀释液(含 0.25% 脱脂乳的 PBST)

称取 0.25 g 脱脂乳, 加入 100 mL 的 PBST 溶液中, 现用现配。

D.5 底物溶液**D.5.1 底物溶液 A**

TMB(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, 分析纯)	200 mg
无水乙醇	100 mL
灭菌蒸馏水加至 1 L。	

D.5.2 底物溶液 B

十二水磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	71.7 g
柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)	9.33 g
0.75% 过氧化脲	
(0.75 g 过氧化脲溶于 100 mL 灭菌蒸馏水中)	6.4 mL
加灭菌蒸馏水至 1 L, pH 调至 5.0~5.4。	

D.5.3 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。

D.6 终止液(2 mol/L H_2SO_4)**D.6.1 终止液成分**

硫酸(浓度 98% H_2SO_4) 54 mL

灭菌蒸馏水 250 mL

D.6.2 终止液制备方法

D.6.2.1 量取 250 mL 灭菌蒸馏水倒入容器中,量取 54 mL 浓硫酸,用玻璃棒引流,沿器壁慢慢注入水中,并不停地搅动散热(防止迸溅)。

D.6.2.2 量取 100 mL 灭菌蒸馏水冲洗量取浓硫酸的量杯,将其慢慢倒入硫酸溶液中,再用 50 mL 灭菌蒸馏水洗一次,慢慢将其倒入硫酸溶液中,最后定容至 500 mL。

中华人民共和国
农业行业标准
水貂阿留申病诊断技术

NY/T 4041—2021

* * *

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)

北京科印技术咨询有限公司印刷

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

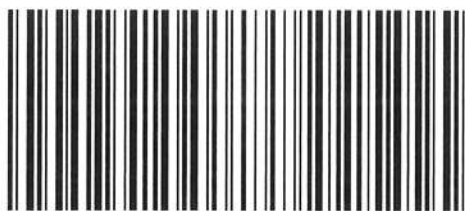
2022年4月第1版 2022年4月北京第1次印刷

书号: 16109·8939

定价: 42.00 元

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261



NY/T 4041—2021