**ICS 11.220**

**CCS B 41**

**NY**

中华人民共和国农业行业标准

**NY/T XXX-202X**

代替 NY/T 1953-2010

猪附红细胞体病诊断技术

**Diagnostic technique for *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis* )**

（送审稿）

**XXXX发布XXXX实施**

**中华人民共和国农业农村部发布**

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

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。

本文件代替NY/T 1953-2010《猪附红细胞体病诊断技术规范》，与NY/T 1953-2010相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

—— 更改了标准名称（见标准名称，2010年版的标准名称）；

—— 更改了范围（见第1章，2010年版的第1章）；

—— 增加了规范性引用文件（见第2章）；

—— 增加了缩略语（见第4章）；

—— 增加了生物安全措施（见第5章）；

—— 增加了疑似猪附红细胞体感染判定（见6.4）；

—— 增加了样品采集、保存与运输（见第7章）；

—— 删除了样品的采集（见2010年版2.3.3）；

—— 增加了疑似猪附红细胞体感染判定（见8.3）；

—— 更改了核酸提取（见9.5，2010年版的2.3.5）；

—— 增加了荧光RAA检测方法（见第11章）；

—— 增加了间接ELISA抗体检测方法（见第12章）；

—— 增加了阻断ELISA抗体检测方法（见第13章）；

—— 更改了综合判定（见第14章，2010年版的第3章）。

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这些专利的责任。

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：

本文件主要起草人：

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2010年首次发布为NY/T 1953-2010；

——本次为第一次修订。

猪附红细胞体病诊断技术

1. 范围

本文件规定了猪附红细胞体病的临床诊断、样品采集保存与运输、涂片镜检、普通PCR检测方法、实时荧光PCR检测方法、荧光RAA检测方法、间接ELISA抗体检测方法、阻断ELISA抗体检测方法等诊断方法。

本文件适用于对猪附红细胞体病的诊断。

1. 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）适用本文件。

GB 19489 实验室生物安全通用要求

1. 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

1. 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DEPC：焦碳酸二乙酯(Ｄiethy Pyrocarbonate)

DNA：脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic acid)

dNTPs：脱氧核糖核苷三磷酸(Deoxyribonucleoside Triphosphates)

ELISA：酶联免疫吸附试验（Enzyme Linked Immunosorbent Assay）

*E.suis：*猪附红细胞体(Eperythrozoon suis)

OD：光密度（Optical Density）

PBS：磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffer Solution)

PCR：聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction)

RAA：重组酶介导等温核酸扩增技术（Recombinase Aided Amplification）

1. 生物安全措施

进行猪附红细胞体实验室检测时，如样品处理、核酸提取等，生物安全措施应按照GB 19489执行。

1. 临床诊断
   1. 流行病学特点

猪附红细胞体除感染猪外，还可感染人及绵羊、牛、鼠、猫等多种动物，为人畜共患病原体。发病猪和隐性感染猪是本病的传染源。不同年龄、性别、品种的猪均易感。本病一年四季均可发生，尤其是夏秋季节。主要通过吸血昆虫传播，或通过血液污染的针头和器械传播，也可垂直传播。

* 1. 临床症状
     1. 发热，体温升高到40℃～42℃，食欲下降，精神萎顿，呼吸困难，排棕红色尿液；
     2. 感染初期皮肤潮红，后期背部及四肢末稍发绀，特别是耳廓边缘发绀；
     3. 贫血，全身皮肤及可视粘膜苍白或黄染；
     4. 慢性病猪表现消瘦、苍白、部分猪出现荨麻疹或病斑型皮肤变态反应；
     5. 血液稀薄，凝固不良，红细胞数量减少；
     6. 母猪繁殖障碍。
  2. 病理变化
     1. 全身肌肉色泽变淡，脂肪及肺、胸腔、胃、肠、膀胱等内脏器官浆膜有不同程度的黄染；
     2. 淋巴结、脾脏、肝脏肿大；肾脏肿大，质地变脆，外观黄染；
     3. 膀胱蓄积棕红色尿液，粘膜黄染。
  3. 结果判定

易感动物出现上述临床症状和/或病理变化，可初步判定为疑似猪附红细胞体感染。

1. 样品采集、保存与运输
   1. 样品的采集
      1. 镜检样品

自耳静脉或前腔静脉无菌采血，将采集的新鲜血样加等量的生理盐水稀释后用于直接涂片镜检；或者将采集的新鲜血样进行涂片染色镜检。

* + 1. 抗凝血样品

用无菌注射器先吸入0.1%肝素0.5 mL～1 mL，再自耳静脉或前腔静脉采集10倍量血液，快速混匀后转入无菌离心管中，编号备用。可用于普通PCR检测、实时荧光PCR检测、荧光RAA检测。

* + 1. 血清样品

自耳静脉或前腔静脉无菌采血，每头应不少于 5 mL，无菌分离血清，装入 2 mL 离心管中，编号备用。可用于ELISA检测。

* 1. 保存与运输

样品采集后置保温箱中，加入预冷的冰袋，宜24 h内运送到实验室。样品密封后在2 ℃～8 ℃条件下保存应不超过24 h，如超过24 h应冷冻保存。

1. 涂片镜检
   1. 直接涂片镜检

将采集的新鲜血样加等量的生理盐水稀释后吸取一滴置载玻片上，加盖玻片，置光学显微镜下观察，猪附红细胞体感染猪可见红细胞发生形态学变化，呈锯齿状、菜花状或星芒状等；健康猪红细胞形态规则。

* 1. 涂片染色镜检

将采集的新鲜血样直接涂片，采用姬姆萨氏染色镜检，猪附红细胞体感染猪红细胞呈波浪状，星芒状，锯齿状改变，且周围有染成紫红色的小体（图1A）；健康猪红细胞形态规则，边缘光滑，染色均匀(图1B)。

A

B



**图1 猪血液涂片, 姬姆萨染色（400×）**

* 1. 结果判定

符合8.1和/或 8.2，判定为疑似猪附红细胞体感染。

1. 普通PCR检测方法
   1. 试剂
      1. TE缓冲液、阳性对照、阴性对照、无核酸酶水、TAE缓冲液、1.2 % 的琼脂糖凝胶，配制方法见附录A。
      2. 商品化DNA提取试剂盒。
      3. 6×上样缓冲液。
      4. DNA分子量标准。
   2. 仪器设备
      1. 自动化核酸提取仪。
      2. PCR扩增仪。
      3. 台式低温高速离心机（最大离心力12000×g以上）。
      4. 稳压稳流电泳仪和水平电泳槽。
      5. 凝胶成像系统（或紫外透射仪）。
      6. 微量可调移液器（0.1 µL～0.25 µL；0.5 µL～10 µL；2 µL～20 µL；20 µL～200 µL；100 µL～1 000 µL等不同规格）。
   3. 引物

针对猪附红细胞体的基因保守序列设计。上游引物E.suis-P1：5'-ATTTAC CGCATGGTAGATATTTG-3'；下游引物E.suis-P2：5'-AGAAACTTTCCACTCTTCTCAC-3'。扩增产物大小为666 bp。

* 1. 样品的处理

取500 μL待检样品加入1.5 mL 离心管中，4℃条件下12 000×g 离心20 min，弃上清，沉淀中加入400 μL TE缓冲液溶解。取阳性对照、阴性对照各1 μL，分别加入400 μL TE缓冲液，混匀。

* 1. 核酸提取

采用商品化DNA提取试剂盒按照说明书提取各类样品中的核酸，或用自动化核酸提取仪提取各类样品中的核酸。如在2 h内检测可将提取的核酸置于冰上保存，否则应置于－20℃冰箱保存。

* 1. PCR扩增
     1. 配制PCR反应体系

PCR体系配制见表1。体系配好后盖紧PCR反应管，并做好标记。

表1 PCR体系配制表

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂成分 | 加入体积 |
| 10×PCR缓冲液(含Mg2+) | 2.5 µL |
| 2.5 mM dNTPs | 2 µL |
| Ex *Taq* DNA聚合酶(5 U/µL) | 0.25 µL |
| E.suis-P1（20 µM/L） | 0.5 µL |
| E.suis-P2（20 µM/L） | 0.5 µL |
| 无核酸酶水 | 16.25 µL |
| 总体积 | 22 µL |

* + 1. PCR反应

将22 µL PCR反应混合液加入到每个 0.2 mL PCR 管；将 3 µL DNA 模板加入到 PCR 管。每次进行普通 PCR 扩增时均设阳性、阴性及空白对照。阳性对照应用阳性对照样品所提取核酸作为模板，阴性对照应用阴性对照样品所提取核酸作为模板，空白对照应用无核酸酶水作为模板。加入模板后，密封反应管，充分混匀，瞬时离心。将所有 PCR 管放在 PCR 仪中。按如下条件运行扩增程序：95 ℃ 预变性5 min；94 ℃ 45 s，64 ℃ 45 s，72 ℃ 45 s，共 35个循环；最后72 ℃延伸10 min。反应结束后取出产物置于4 ℃。

* 1. PCR扩增产物的电泳检测

制备1.2%的琼脂糖凝胶，在电泳槽中加入1×TAE核酸电泳缓冲液，使液面刚刚没过凝胶。取5 μL～10 μL PCR扩增产物和1 μL～2 μL 6×电泳上样缓冲液混合后，分别加样到各凝胶孔中，取5 μL DNA分子量标准加到一凝胶孔中。5 V/cm恒压下电泳30 min左右，将电泳结束后的凝胶置凝胶成像系统或紫外透射仪中观察结果，进行判定并做好试验记录。

* 1. 试验结果成立条件

猪附红细胞体核酸阳性对照的PCR扩增产物，经电泳后在666 bp 位置出现特异性条带，同时阴性对照PCR产物电泳后在666bp位置没有目的条带（见附录B.1），则该次试验结果成立；否则，结果不成立。

* 1. 结果判定

在试验结果成立的前提下，如果被检样品的PCR产物电泳后在666 bp 位置上出现特异性扩增条带，判为猪附红细胞体核酸阳性；若条带极弱，应复检一次，再次出现666 bp大小条带判定为猪附红细胞体核酸阳性；否则，判为阴性。

1. 实时荧光PCR检测方法
   1. 试剂

除不需要TAE核酸电泳缓冲液、6×上样缓冲液、DNA分子量标准外，其他试剂同9.1。

* 1. 仪器设备

除不需要PCR扩增仪、稳压稳流电泳仪、水平电泳槽和凝胶成像系统外，其他仪器设备同9.2，并增加实时荧光PCR仪。

* 1. 引物和探针

针对猪附红细胞体的基因保守序列设计。上游引物E.suis-P3：5'- ACTGTCCCTACATA CTGGTTCTTG-3'；下游引物E.suis-P4：5'-AGGAGAGGGTCACCCAGATC-3'；TaqMan探针E.suis-Probe1：5'-FAM-AGCCTCACTGCGTCCAAGTTCA-BHQ1-3'。

* 1. 核酸提取

同9.5。

* 1. 实时荧光PCR扩增
     1. 配制实时荧光PCR反应体系

PCR体系配制见表2。体系配好后盖紧PCR反应管，并做好标记。

**表2 实时荧光PCR体系配制表**

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂成分 | 加入体积 |
| 10×PCR缓冲液(含Mg2+) | 2.5 µL |
| 2.5 mmol/L dNTPs | 2 µL |
| Ex *Taq* DNA聚合酶(5 U/µL) | 0.25 µL |
| E.suis-P3（20 µM/L） | 0.5 µL |
| E.suis-P4（20 µM/L） | 0.5 µL |
| E.suis-Probe1（10 µM/L） | 1.0 µL |
| 无核酸酶水 | 15.25 µL |
| 总体积 | 22 µL |

* + 1. 实时荧光PCR反应

将22 µL PCR反应混合液加入到每个0.2 mL PCR管；将3 µL cDNA 模板加入到PCR管。每次进行实时荧光PCR 扩增时均设阳性、阴性及空白对照。阳性对照应用阳性对照样品所提取核酸作为模板，阴性对照应用阴性对照样品所提取核酸作为模板，空白对照应用无核酸酶水作为模板。加入模板后，密封反应管，充分混匀，瞬时离心。将所有 PCR管放在荧光PCR仪中。95 ℃预变性2 min，95 ℃ 15 s，60 ℃ 40 s，共40 个循环，在每个循环的延伸结束时进行FAM荧光信号收集。

* 1. 试验结果成立条件

猪附红细胞体阳性对照的Ct 值应＜30且出现特异性扩增曲线（见附录B.2），阴性对照应无 Ct 值或 Ct 值≥40且无特异性扩增曲线，试验结果有效；否则应重新进行试验。

* 1. 结果判定
     1. 在试验结果成立的前提下，被检样品Ct 值≤30 且出现特异性扩增曲线，判为猪附红细胞体核酸阳性。
     2. 当无 Ct 值或 Ct值＞32且无特异性扩增曲线，判为猪附红细胞体核酸阴性。
     3. 当 30＜Ct 值≤32且出现特异性扩增曲线，判为疑似。疑似样品应复检1次，若Ct 值≤30且出现特异性扩增曲线即判为猪附红细胞体核酸阳性，否则判为猪附红细胞体核酸阴性。

1. 荧光RAA检测方法
   1. 试剂
      1. RAA反应预混液。
      2. 280 mmol/L乙酸镁。
      3. 除不需要TAE核酸电泳缓冲液、6×上样缓冲液、DNA分子量标准外，其他试剂同9.1。
   2. 仪器设备
      1. 恒温荧光基因检测仪/荧光定量PCR仪。
      2. 台式低温高速离心机（ 最大离心力12000 g以上 ）。
      3. 微量可调移液器 （0.1 µL～0.25 µL；0.5 µL～10 µL；2 µL～20 µL；20 µL～200 µL；100 µL～1 000 µL等不同规格）。
   3. 引物和探针

针对猪附红细胞体的基因保守序列设计引物和探针。上游引物*E.suis*-P5：5'-TCTGGCGGACTCCAGATCTGGGTGACCCTC-3'；下游引物*E.suis*-P6：5'-TGCAAGGCCTGAGTGAATATCCGCTGATGC-3'；探针*E.suis*-Probe2：CTGAGCCCCTGCCTCTCAGAACCCGCCTCC[FAM-dT][THF]G[BHQ1-dT]CCATCTGAAATTGCC。

* 1. 核酸提取

同9.5。

* + 1. 核酸扩增
    2. 配制荧光RAA反应体系

每个样品配制44.5 µL荧光RAA反应混合液，体系配制见表3。

**表3 荧光RAA反应体系配制表**

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂成分 | 加入体积 |
| RAA反应预混液 | 29.6 µL |
| E.suis-P5（20 µM/L） | 2µL |
| E.suis-P6（20 µM/L） | 2 µL |
| E.suis-Probe2（10 µM/L） | 1 µL |
| 无核酸酶水 | 9.9 µL |
| 总体积 | 44.5 µL |

* + 1. 荧光RAA反应

将44.5µL 荧光RAA反应混合液加入到荧光RAA反应管中，将3 µL DNA模板加入到反应管中，将2.5 µL乙酸镁加在反应单元管盖上，混合均匀。每次进行荧光RAA扩增时均应设立阳性、阴性及空白对照。阳性对照应用阳性对照样品所提取核酸作为模板，阴性对照应用阴性对照样品所提取核酸作为模板，空白对照应用无核酸酶水作为模板。加入模板后，密封反应管，充分混匀，瞬时离心。完成混匀收集后，将所有反应管放入荧光恒温检测仪中。反应程序为：39 ℃ ，60 s，共1 个循环；39℃ ，30s，共40 个循环，在每个循环的延伸结束时进行荧光信号收集。

* 1. 试验成立条件

阳性对照起峰时间≤10 min（Ct值≤30）且出现特异性起峰曲线（见附录B.3），阴性对照无起峰时间或阴性对照起峰时间＞15min（Ct值＞40）且无特异性起峰曲线，试验结果有效；否则应重新进行试验。

* 1. 荧光RAA结果判定

在试验结果成立的前提下，被检样品起峰时间≤12min（Ct值≤36）且出现特异性起峰曲线，则判为猪附红细胞体核酸阳性；被检样品无起峰时间或被检样品起峰时间 ＞12min（Ct值＞36）且无特异性起峰曲线，则判定为猪附红细胞体核酸阴性。

1. 间接ELISA抗体检测方法
   1. 试剂
      1. 包被抗原：大肠杆菌系统重组表达的猪附红细胞体p40蛋白，制备及鉴定方法见附录C。
      2. 酶标抗体：辣根过氧化物酶标记的羊抗猪二抗。
      3. 对照：猪附红细胞体抗体阳性对照（阳性血清）、阴性对照（阴性血清），制备方法见附录D。
      4. PBS、包被液、洗涤液、封闭液、样品稀释液、酶结合物稀释液、终止液，配制方法见附录E。
      5. 底物溶液：商品化即用型TMB底物溶液。
   2. 仪器设备
      1. 酶标仪。
      2. 恒温箱。
      3. 洗板机或洗涤瓶。
      4. 96孔酶标板。
      5. “U”型96孔稀释板。
      6. 微量可调移液器（2.5μL、10μL、100μL、200μL、1000μL等不同规格）。
      7. 贮液槽。
   3. 试验程序
      1. 包被

用包被缓冲液将猪附红细胞体重组p40蛋白稀释至终浓度0.25μg/mL，每孔100μL包被，37℃饱和湿度下吸附2h，用洗涤缓冲液洗板1次后拍干，300μL/孔加入封闭缓冲液，37℃饱和湿度下吸附2h，用洗涤缓冲液洗板1次后拍干。

* + 1. 操作步骤
       1. 待检血清与阴性、阳性对照血清使用样品稀释液做50倍稀释。
       2. 酶标板上对照和待检样品的分布图，见表4。50μL/孔，在A1、B1加入稀释后的阳性对照血清，在C1、D1中加入稀释后的阴性对照血清，从E1、F1开始按顺序在其余孔加入稀释后的待检血清，37℃孵育60min。
       3. 弃去反应孔中的液体，每孔用洗涤液清洗4次，1×洗涤液300μL /孔。
       4. 每孔加入1×酶标抗体，50μL /孔，37℃孵育30min。
       5. 弃去反应孔中的液体，每孔用洗涤缓冲液清洗4次，1×洗涤液300μL/孔。
       6. 每孔加入底物溶液，50μL/孔，室温避光作用10min。
       7. 每孔中加入50μL终止液，终止反应。
       8. 用酶标仪在450nm波长下测定各孔OD值。

表4 样品加样记录表（推荐模式）

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | P | S5 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| B | P | S6 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| C | N | S7 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| D | N | S8 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| E | S1 | S9 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| F | S2 | S10 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| G | S3 | S11 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| H | S4 | S12 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

注：P为阳性对照孔；N为阴性对照孔；S1、S2、S3、S4等为待检样品孔，其余类推。

* 1. 试验成立条件

阳性对照OD450nm值＞0.800，且阴性对照OD450nm值＜0.100，试验结果有效；否则，应重新进行试验。

* 1. 结果判定

在试验成立的前提下，S/N值的计算：S/N=待测样品OD450nm值）/阴性对照OD450nm值，如果S/N值≥2.1，应判定为猪附红细胞体抗体阳性；如果S/N值＜2.1，应判定为猪附红细胞体抗体阴性。

1. 阻断ELISA抗体检测方法
   1. 试剂
      1. 包被抗原：重组表达的猪附红细胞体p40蛋白，制备及鉴定方法见附录C。
      2. 酶标抗体：辣根过氧化物酶标记的p40蛋白单抗，制备方法见附录F。
      3. 对照：猪附红细胞体阳性对照（阳性血清）、阴性对照（阴性血清），制备方法见附录D。
      4. 包被液：PBS、包被液、洗涤液、封闭液、样品稀释液、酶结合物稀释液、终止液，配制方法见附录E。
      5. 底物溶液：商品化即用型TMB底物溶液。
   2. 仪器设备

见12.2。

* 1. 试验程序
     1. 包被

用包被缓冲液将猪附红细胞体重组p40蛋白稀释至终浓度0.25 μg/mL，每孔100 μL包被，37℃饱和湿度下吸附2 h，用洗涤缓冲液洗板1次后拍干，300 μL/孔加入封闭缓冲液，37 ℃饱和湿度下吸附2 h，用洗涤缓冲液洗板1次后拍干。

* + 1. 操作步骤
       1. 待检血清与阴性、阳性对照血清使用样品稀释液做50倍稀释。
       2. 酶标板上对照和待检样品的分布图，见表5。50μL/孔，在A1、B1加入稀释后的阳性对照血清，在C1、D1中加入稀释后的阴性对照血清，从E1、F1开始按顺序在其余孔加入稀释后的待检血清，37℃孵育60 min。
       3. 弃去反应孔中的液体，每孔用洗涤液清洗4次，1×洗涤液300μL /孔。
       4. 每孔加入1×酶标抗体，50μL /孔，37℃孵育30min。
       5. 弃去反应孔中的液体，每孔用洗涤缓冲液清洗4次，1×洗涤液300μL/孔。
       6. 每孔加入底物溶液，50μL/孔，室温避光作用10min。
       7. 每孔中加入50μL终止液，终止反应。
       8. 用酶标仪在450nm波长下测定各孔OD值。

表5 样品加样记录表（推荐模式）

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | P | S5 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| B | P | S6 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| C | N | S7 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| D | N | S8 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| E | S1 | S9 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| F | S2 | S10 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| G | S3 | S11 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| H | S4 | S12 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

注：P为阳性对照孔；N为阴性对照孔；S1、S2、S3、S4等为待检样品孔，其余类推。

* 1. 试验成立条件

阳性对照OD450nm值＞0.800，且阴性对照OD450nm值＜0.100，试验结果有效；否则，应重新进行试验。

* 1. 结果判定

在试验成立的前提下，S/N值的计算： S/N=（阴性对照OD450nm值–待测样品OD450nm值）/（阴性对照OD450nm值-阳性对照OD450nm值），如果S/N值≥0.4，应判定为猪附红细胞抗体阳性；如果S/N值＜0.4，应判定为猪附红细胞抗体阴性。

1. 综合判定
   1. 疑似

符合6.4和/或8.3，可判为疑似猪附红细胞体感染。

* 1. 确诊

符合14.1，且经普通PCR检测方法（第9章）、实时荧光检测PCR方法（第10章）、荧光RAA检测方法（第11章）任一项判为核酸阳性的，或经间接ELISA抗体检测方法（第12章）或阻断ELISA抗体检测方法（第13章）任一项检出抗体阳性的，可确诊为猪附红细胞体感染。

附 录 A

（规范性）

PCR反应溶液的配制

* 1. TE缓冲液

10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)，1 mmol/L EDTA(pH 8.0)，充分混匀。

* 1. 阳性对照

猪附红细胞体功能性结构蛋白编码基因ORF2的pGEM-T easy重组质粒（1.0×105 拷贝/μ L）。

ORF2目的片段基因序列为：5’-ATGGAGCATACCTGGGCCTGGAGAGCACCAGGTTGGTCTTTACAAAAGGGGGCACCAGAAAGGCGAGGTTCTGCAAACTGTGTACCCTTTTCACAATCTCCACTGCTAGCTAGCTGTCCACTTTCCAGACAACCCCCCCCAAAAAACACAAACACCCCCCCCCCCCCCCAcAAGCACACAAACACACACACACACACCTTTCCTGGTAAACAGGAACTAGTGCAGATAGGACCTAAAAAATGAAGCACCAGTTTGCCCTGAGAACTGTCCCTACATACTGGTTCTTGCCCAGCCTCACTGCGTCCAAGTTCCAGATCTGGCGGACTCCAGATCTGGGTGACCCTCTCCTGAGCCCCTGCCTCTCAGAACCCGCCTCCTGGTCCATCTGAAATTGCCACTGCAGTAGCTCAAAACTGAGGTCCTAAAGCCGAGCATCAGCGGATATTCACTCAGGCCTTGCAGGGTGCATGGAGGACGACTGTCCTCCGGCAGCCTCATCTCCTCGCAGCGCCATCCAGCGGTGAGACAGCAAGGGCACCCTGGGCAGAGATTGCTGGCCAGGCACCCCTGAAACCTGGTGCGGAGGATTCCAAGCCTGAAGCCGTCCCTTCCTCCATCCACCCCACCCCTAAAATTAGGACACATCTATCTCCTGCACCTTCCCAC-3’

* 1. 阴性对照

pGEM-T easy空质粒（1.0×105拷贝/μ L）。

* 1. 无核酸酶水

量取1 mL 的DEPC，加入去离子水定容至1000 mL，充分混匀，将瓶盖拧松后置于 37℃放置过夜，高压灭菌。

* 1. 1×TAE核酸电泳缓冲液

称取24.2 g Tris 碱，加入5.71 mL的冰乙酸和10 mL 的0.5 mol/L EDTA(pH8.0)，加蒸馏水定容至100 mL，使用时用蒸馏水作50倍稀释，即为1×TAE核酸电泳缓冲液。

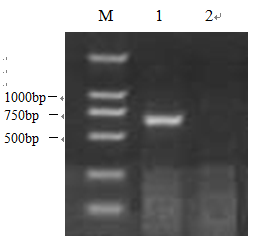
* 1. 1.2%的琼脂糖凝胶

称取 0.6 g 琼脂糖，置于200 mL锥形瓶中，加入50 mL 1×TAE 缓冲液，加热溶解，冷却至 50-60℃时加入 2.5 μL 溴化乙锭溶液，混匀后倒入胶槽内自然凝固。

附 录 B

（资料性）

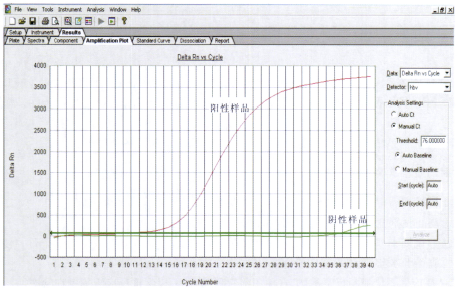
猪附红细胞体PCR扩增产物电泳图、荧光PCR及荧光RAA扩增曲线图

B.1猪附红细胞体PCR扩增产物电泳图见图B.1。

注：M.DL2000 DNA Marker；1.猪附红细胞体阳性对照；2.阴性对照

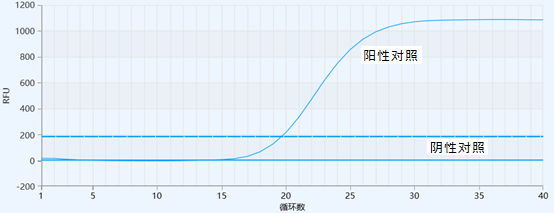
图B.1猪附红细胞体PCR扩增产物电泳图

B.2猪附红细胞体荧光PCR扩增曲线图见图B.2。



图B.2猪附红细胞体荧光PCR扩增曲线图

B.3猪附红细胞体荧光RAA扩增曲线图见图B.3。



图B.3猪附红细胞体荧光RAA扩增曲线图

附 录 C

（资料性）

重组表达猪附红细胞体p40蛋白的制备及鉴定

C.1 重组菌株的诱导表达与纯化

将切除信号肽的猪附红细胞体p40基因插入pET-32a原核表达载体并转化如大肠杆菌，构建*E.coli*-pET-32a-p40重组表达菌。将*E.coli*-pET-32a-p40接种于含有Amp+（100µg/mL）LB固体培养基中，置37℃培养过夜，挑取单菌落接种于含Amp+（100µg/mL）LB液体培养基，置37℃、220r/min摇床振荡培养至OD600nm在0.5～0.6之间，取1mL *E.coli*-pET-32a-p40菌液作为诱导前对照，随后再加入IPTG至终浓度为1mM，置于37℃、220r/min的摇床中振荡培养8小时。取1mL诱导表达好的菌液至离心管内，8000r/min离心3分钟，去掉上清，用PBS洗涤一次后加入30µL PBS重悬细菌，再加10µL 4×SDS蛋白上样缓冲液，混匀后煮沸10分钟，4℃条件下、以10000r/min离心1分钟，取5µL进行10%的SDS-PAGE电泳，确定在分子量46kDa大小处表达出目的蛋白（r-p40），用Western blot方法分析r-p40蛋白的抗原性。收集剩下的菌液表达并纯化r-p40蛋白，纯化后的 r-p40蛋白经浓度测定，每毫升蛋白量应不低于0.05 mg。

C.2 重组表达猪附红细胞体p40蛋白的反应性及特异性鉴定

将纯化的r-p40蛋白用包被缓冲液稀释成0.5µg/mL包被ELISA板，用间接ELISA方法测定，与猪附红细胞体抗体阳性血清的S/N值应≥2.1，而与非洲猪瘟病毒（ASFV）抗体阳性血清、猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV）抗体阳性血清、猪瘟病毒（CSFV）抗体阳性血清、猪伪狂犬病毒（PRV）抗体阳性血清、猪流行性腹泻病毒（PEDV）抗体阳性血清、猪传染性胃肠炎病毒（TGEV）抗体阳性血清、猪δ冠状病毒（PDCoV）抗体阳性血清及pET-32a空载体大肠杆菌BL21plysS（空载体蛋白）抗体阳性血清的S/N值均应＜2.1。

附 录 D

（资料性）

猪附红细胞体阳性对照（阳性血清）、阴性对照（阴性血清）的制备及鉴定

D.1猪附红细胞体抗原的制备

无菌采集感染猪附红细胞体猪的前腔静脉抗凝血，采用淋巴细胞分离液经3000r/min离心20min分离出抗凝血中的白细胞、血小板及细胞碎片等组分，然后收集红细胞泥；用PBS悬浮，置于0.15%Tween-20及3%EDTA的pH为7.4的PBS缓冲液中50℃水浴中热致敏30min，1600r/min离心10min收集上清液。经1.2um滤器过滤后，滤液12000 r/min离心1h，沉淀即为猪附红细胞体，沉淀经PBS反复离心洗涤3次后去除残余宿主血浆蛋白，加1mL PBS重悬沉淀，超声波裂解10min，经2000r/min离心10min，取上清液即为猪附红细胞体抗原，-20℃保存。

D.2猪附红细胞体抗体阳性对照（阳性血清）制备

用猪附红细胞体免疫小型猪(首免加入弗氏完全佐剂，二免加入弗氏不完全佐剂)，最后一次免疫2周后心脏采血分离血清；用纯化r-p40蛋白包被ELISA板检测抗体效价，以测定孔OD值(S)/阴性对照孔OD值(N)≥2.1判为阳性，S/N<1.5判为阴性。测定猪血清抗体效价≥1:16000时，大量采集全血分离血清，56 ℃ 30 min 水浴补体灭活后分装于 2 mL 冻存管中，每管 1 mL，-70 ℃ 冰箱保存，作为猪附红细胞体抗体阳性对照（阳性血清）。

D.3猪附红细胞体抗体阴性对照（阴性血清）制备

选择猪附红细胞体抗体阴性小型猪（用纯化r-p40蛋白包被ELISA板检测抗体为阴性）采集全血，分离血清，灭活后作为猪附红细胞体抗体阴性对照（阴性血清）。

附 录 E

（规范性）

ELISA反应溶液的配制

E.1包被液（含0.05mol/L CBS，pH 9.6）

称取1.59g碳酸钠 (Na2CO3，分析纯) 、2.93g碳酸氢钠 (NaHCO3，分析纯) ，加纯化水定容至1000 mL。

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

称取0.2 g磷酸二氢钾（KH2PO4，分析纯）、2.89 g十二水磷酸氢二钠（Na2HPO4·12H2O，分析纯）、8.0 g氯化钠（NaCl，分析纯）、0.2 g氯化钾（KCl，分析纯），0.5 mL加入吐温-20，加纯化水定容至1000 mL。

E.3封闭液

称取1 g牛血清白蛋白（BSA）、5g蔗糖，再加洗涤液定容至100 mL。

E.4样品稀释液

称取1 g酪蛋白（Casein）、5g氯化钠（NaCl，分析纯），再加洗涤液定容至100 mL。

E.5酶结合物稀释液

称取1 g牛血清白蛋白（BSA），加入400μL Proclin 300，再加洗涤液定容至100 mL。

E.6终止液的配制

量取442 mL蒸馏水，量取58 mL硫酸（H2SO4，分析纯）缓慢加入蒸馏水中。

E.7 pH 7.2 0.01mol/L PBS的配制

称取0.2 g磷酸二氢钾（KH2PO4，分析纯）、2.89 g十二水磷酸氢二钠（Na2HPO4·12H2O，分析纯）、8.0 g氯化钠（NaCl，分析纯）、0.2 g氯化钾（KCl，分析纯），加纯化水定容至1000 mL，用氢氧化钠或盐酸调pH至7.2。

附 录 F

（资料性）

猪附红细胞体p40单克隆抗体的制备

F.1免疫小鼠

将猪附红细胞体抗原与弗氏佐剂混合乳化，皮下多点注射免疫 Balb/c 小鼠 3 次，用间接ELISA方法测定免疫小鼠的血清抗体效价，以S/N值≥2.1时抗体的最大稀释度作为抗体效价。选取效价大于 1:100000的小鼠于细胞融合前 3 d 加强免疫一次。

F.2细胞融合

选择状态良好且呈对数生长的sp2/0细胞6～8瓶，将细胞从瓶壁上轻轻吹打下来并转移到50mL离心管中，以1000r/min离心5分钟。弃上清，用5mL无血清DMEM培养液悬浮，用细胞计数板计数；脾细胞与骨髓瘤细胞sp2/0按细胞数量1:5混合均匀，1000r/min离心10分钟，倒掉上清，轻弹管底使其疏松；在一个干净的烧杯中加入37℃蒸馏水，将含有混合细胞的离心管置于水浴中，1分钟内逐滴加入1mL 37℃预热的聚乙二醇PEG2000，边滴加边旋转离心管，加完后温浴90秒；在1分钟内逐滴加入1mL 37℃预热的不完全DMEM培养液；在1分钟内逐滴加入2mL 37℃预热的不完全DMEM培养液；在1分钟内逐滴加入4mL 37℃预热的不完全DMEM培养液；再用37℃预热的不完全DMEM培养液补加至20mL，1000r/min离心5分钟，倒掉上清；将细胞沉淀重悬于60mL 20%胎牛血清的HAT选择培养液中，以100µL/孔加入含有饲养细胞的96孔细胞培养板中，置于37℃、5%CO2培养箱培养。

F.3杂交瘤细胞的筛选

融合后第5天用HAT培养液进行第1次半量换液，第9日进行全换液，待细胞长到孔底的1/4～1/3时吸出80µL上清分别加至r-p40包被板进行ELISA检测，以S/N≥2.1作为阳性判断标准，以免疫阳性血清作阳性对照，正常小鼠血清作阴性对照，对分泌上清检测为r-p40抗体阳性的细胞株进行克隆化培养。

F.4杂交瘤细胞的克隆化

采用有限稀释法对检测阳性的杂交瘤细胞及时进行克隆化培养。制备饲养细胞，HT培养液中制备饲养细胞层100µL/孔；轻轻吹打混匀阳性杂交瘤细胞，细胞计数后调整细胞数至10个/mL；将杂交瘤细胞悬液100µL/孔接种于含饲养细胞的96孔细胞培养板中，37℃、5%CO2培养箱中进行培养；每日观察并记录每孔细胞克隆数，待细胞长到孔底的1/4～1/3时，对细胞上清用单抗筛选用间接ELISA方法进行检测；选择克隆数少、OD450nm值高的双阳性孔，将其再次克隆。经3～4次克隆化操作，直至所有克隆化细胞孔检测阳性率达100%时，即可确定获得分泌特异性单抗的杂交瘤细胞株。将克隆化的单克隆抗体杂交瘤细胞株扩大培养，分装冻存。

F.5抗体纯化标记

采用体内诱生腹水法制备单克隆抗体，12～16周龄健康Balb/c小鼠，每只小鼠腹腔注射弗氏不完全佐剂0.5mL，7～10日后每只小鼠腹腔接种l×106～5×106个杂交瘤细胞，经7～10日后可见小鼠腹部明显膨大，无菌操作采集腹水。腹水以8000r/min、离心10分钟，弃去上层脂肪层，收集中层腹水，采用免疫层析柱对抗体进行纯化，进行辣根过氧化物酶标记，通过间接ELISA测定效价后并分装保存于 -20 ℃。

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_