

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 3233—2018

鸭坦布苏病毒病诊断技术

Diagnostic techniques for duck Tembusu viral disease

2018-05-07 发布

2018-09-01 实施

中华人民共和国农业农村部 发布

目 次

前言 II

引言 III

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 缩略语 1

4 临床诊断 1

5 病毒分离鉴定 2

6 病毒特异性抗体检测 7

7 鸭坦布苏病毒病综合判定 9

附录 A(规范性附录) 溶液试剂配制 11

附录 B(资料性附录) 免疫荧光检测方法中所用坦布苏病毒的单抗 13

附录 C(资料性附录) 阳性对照病毒(FX2010) 14

附录 D(资料性附录) 样品的采集、处理、运输及保存 15

附录 E(资料性附录) 坦布苏病毒特异反转录引物、RT-PCR、荧光 RT-PCR 的引物和探针 17

附录 F(资料性附录) ELISA 抗原和血清标准 18

附录 G(资料性附录) 鸭坦布苏病毒血凝抑制试验抗原 19

附录 H(资料性附录) HI 抗体检测的鸭血清处理方法 20

附录 I(资料性附录) 检测过程防止交叉污染的措施 21

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:中国农业科学院上海兽医研究所、北京市农林科学院畜牧兽医研究所、中国动物疫病预防控制中心、中国农业科学院兰州兽医研究所。

本标准主要起草人:李泽君、杨健美、李雪松、林健、滕巧泱、闫丽萍、刘玉良、王小蕾、闫大为、顾小雪、王宾宾、杨志远、朱启运、段会娟、刘立新。

引 言

自 2010 年春季以来,我国主要养鸭地区相继暴发一种引起鸭生长迟缓、高热、食欲不振、蛋鸭产蛋下降乃至死亡的新发传染病。研究证实,引起该病的病原为坦布苏病毒(Tembusu virus, TMUV),属于恩塔亚病毒群(Ntaya virus group)、黄病毒属(Flavivirus genus)。该病发病率高达 100%,死亡率在 5%~30%,其传播速度快、感染性强,可引起各种日龄鸭采食下降、高热和部分死亡,导致雏鸭生长迟缓、蛋鸭产蛋下降或停产,对养鸭业的危害巨大。坦布苏病毒病已造成养鸭业数以亿计的经济损失,是近年来危害养鸭业最严重的疾病之一。截至目前,全国主要水禽养殖地区均已受到该病的威胁。

本标准根据临床症状、细胞或鸡胚分离产生病变或死亡进行初步判断坦布苏病毒感染,后续进行病毒鉴定和血清抗体检测进行综合判定。病毒鉴定建立了 3 种检测方法,运用了一株特异性针对坦布苏病毒 E 蛋白的单克隆抗体建立了病毒的细胞免疫荧光检测方法;运用针对坦布苏病毒 PrM 蛋白的基因特异序列设计引物,建立了病毒的 RT-PCR 检测方法;运用了针对坦布苏病毒 E 蛋白的基因特异序列设计了引物和荧光探针,建立了病毒的荧光 RT-PCR 检测方法。血清抗体检测建立了 2 种检测方法,包括运用针对坦布苏病毒的单抗建立的 ELISA 抗体检测方法、运用坦布苏病毒凝集红细胞的特性建立了血凝抑制(HI)抗体检测方法。上述检测方法,可根据实际情况因地制宜地选用。

本文件的发布机构提请注意,声明符合本文件时,可能涉及 4 个条款(5.2.1;5.2.2;5.2.3;6.1;6.2;7.2)与坦布苏病毒分离株及其单抗相关、血凝抑制试验抗原、HI 抗体检测方法相关的 4 个专利的使用。

本文件的发布机构对于该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利持有人已向本文件的发布机构保证,他愿意同任何申请人在合理且无歧视的条款和条件下就专利授权许可进行谈判。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案,相关信息可以通过以下联系方式获得:

专利持有人 1:中国农业科学院上海兽医研究所;专利持有人 2:北京市农林科学院。

地址 1:上海市闵行区紫月路 518 号;地址 2:北京市海淀区曙光花园中路 11 号。

请注意除上述专利外,本文件的某些内容仍可能涉及专利,本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

鸭坦布苏病毒病诊断技术

1 范围

本标准规定了鸭坦布苏病毒病诊断技术的要求。

本标准所规定的临床症状和病理变化适用于鸭坦布苏病毒病的初步诊断；免疫荧光检测方法适用于坦布苏病毒分离和鉴定，反转录-多聚酶链式反应(RT-PCR)和荧光 RT-PCR 检测方法用于坦布苏病毒的核酸鉴定，坦布苏病毒 ELISA 抗体检测方法和 HI 抗体检测方法适用于血清学诊断和免疫鸭群抗体水平的检测。

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

NY/T 541—2016 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

WS/T 230—2002 临床诊断中聚合酶链式反应(PCR)技术的应用

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BSA:牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin)

DEPC:焦磷酸二乙酯(Diethy Pyrocarbonate)

DMEM:含各种氨基酸和葡萄糖的培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium)

E:囊膜糖蛋白(Envelope glycoprotein)

FBS:胎牛血清(Fetal Bovine Serum)

HA:血凝试验(Hemagullatin assay)

HI:血凝抑制(Hemagullatin inhibition)

PBS:磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline)

PBST:吐温磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline with Tween)

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

PrM:膜蛋白前体(Pre - Membrane Proteins)

RT-PCR:反转录-聚合酶链式反应(Reverse - transcript Polymerase Chain Reaction)

TAE:Tris-乙酸电泳缓冲液(Tris Acetate - EDTA Buffer)

4 临床诊断

4.1 流行病学

一年四季均可发生，潜伏期 3 d~5 d。不同日龄的麻鸭、北京鸭、樱桃谷鸭和鹅均易感，发病鸭群的感染率高达 100%，死亡率 1%~15%不等。

4.2 临床症状

雏鸭感染后出现生长迟缓，产蛋鸭感染出现群体性采食量和产蛋量下降、甚至绝产。病鸭精神沉

郁、扎堆,羽毛逆立,拉绿色稀便;少量病鸭出现站立不稳、震颤、行走困难和姿势异常。继发感染、不当的药物治疗或饲养管理不当等因素可使发病鸭的死亡率高达 15%。

4.3 病理变化

卵巢变性、坏死,卵泡变形、充血、出血和破裂,出现卵黄性腹膜炎,输精管萎缩。脾脏肿大。

4.4 临床诊断结果判定

同时符合 4.1、4.2、4.3 判定为疑似鸭坦布苏病毒病。

5 病毒分离鉴定

5.1 病毒分离

5.1.1 细胞分离

5.1.1.1 仪器设备与耗材

5.1.1.1.1 可调移液器:20 μ L、200 μ L、1 000 μ L。

5.1.1.1.2 高压蒸汽灭菌器。

5.1.1.1.3 无菌离心管:1.5 mL、15 mL、50 mL。

5.1.1.1.4 涡旋振荡器。

5.1.1.1.5 冰箱:2℃~8℃、-20℃、-80℃。

5.1.1.1.6 细胞培养箱。

5.1.1.1.7 细胞培养瓶、12 孔细胞培养板。

5.1.1.2 试剂

5.1.1.2.1 磷酸盐缓冲液(PBS),见附录 A 中的 A.1。

5.1.1.2.2 DMEM 细胞培养液。

5.1.1.2.3 胎牛血清(FBS)。

5.1.1.2.4 L-谷氨酰胺。

5.1.1.3 细胞的准备

将生长良好的 DF-1 等敏感细胞用无菌 PBS 洗涤 2 次,弃去 PBS,加入 0.25%胰酶消化为单个细胞,加入少量细胞培养液,用吸管轻轻吹散细胞;再加入适量细胞培养液,用吸管轻轻吹打使细胞分散均匀后,按每孔 1 mL 加入到 12 孔细胞培养板;在 37℃、含 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 24 h~36 h,密度达到 80%时用于病毒分离。

5.1.1.4 样品接种和培养

将上述细胞培养液弃掉,用无菌 PBS 洗涤 3 次后,将处理好的样品加入到细胞上,每孔 0.3 mL~0.5 mL。放入细胞培养箱吸附 1 h~2 h,每隔 15 min 轻轻摇动一次,吸附后弃掉液体,用无菌 PBS 洗涤 3 次~5 次,加入病毒培养维持液,每孔 1 mL。在细胞培养箱中培养 36 h~48 h,收集出现病变的细胞上清液。

5.1.1.5 病毒分离结果判定

显微镜下观察,出现细胞变圆、不融合、不崩解的典型病变,判定为鸭坦布苏病毒疑似样品。

5.1.2 鸡胚(或鸭胚)分离

5.1.2.1 仪器设备与耗材

5.1.2.1.1 可调移液器:200 μ L、1 000 μ L。

5.1.2.1.2 高压蒸汽灭菌器。

5.1.2.1.3 无菌注射器:1 mL、5 mL。

5.1.2.1.4 高压灭菌的剪刀、镊子。

5.1.2.1.5 无菌离心管:1.5 mL、15 mL、50 mL。

5.1.2.1.6 冰箱:2℃~8℃、-20℃、-80℃。

5.1.2.1.7 胚孵化箱。

5.1.2.1.8 种蛋。

5.1.2.2 种蛋准备

将鸡胚(或鸭胚)置于孵化器中 37℃下孵育 9 d(鸭胚孵育 10 d~11 d),用于病毒分离。

5.1.2.3 鸡胚(或鸭胚)接种

将待检样品以 0.1 mL/胚的剂量经卵黄囊途径接种鸡胚(或鸭胚),置 37℃孵育,培养 144 h,弃去 24 h 内死亡胚,收集 24 h~144 h 死亡胚的尿囊液和胚体。

5.1.2.4 鸡胚(或鸭胚)分离结果判定

24 h~144 h 引起鸡胚(或鸭胚)死亡,胚体出现严重水肿,胚体增大(与对照相比),判定为鸭坦布苏病毒疑似样品。

5.2 病毒检测方法

5.2.1 免疫荧光技术

5.2.1.1 仪器设备与耗材

5.2.1.1.1 可调移液器:2 μL、20 μL、200 μL、1 000 μL。

5.2.1.1.2 高压蒸汽灭菌器。

5.2.1.1.3 无菌注射器:1 mL、5 mL。

5.2.1.1.4 无菌离心管:1.5 mL、15 mL、50 mL。

5.2.1.1.5 涡旋振荡器。

5.2.1.1.6 冰箱:2℃~8℃、-20℃、-80℃。

5.2.1.1.7 细胞培养箱。

5.2.1.1.8 细胞培养瓶、12 孔细胞培养板。

5.2.1.1.9 荧光显微镜。

5.2.1.2 试剂

5.2.1.2.1 DMEM 细胞培养液。

5.2.1.2.2 胎牛血清(FBS)。

5.2.1.2.3 牛血清白蛋白(BSA)。

5.2.1.2.4 L-谷氨酰胺。

5.2.1.2.5 4%多聚甲醛。

5.2.1.2.6 0.5% Triton X-100。

5.2.1.2.7 青霉素-链霉素双抗溶液。

5.2.1.2.8 磷酸盐缓冲液(PBS),见 A.1。

5.2.1.2.9 吐温磷酸盐缓冲液(PBST),见 A.2。

5.2.1.2.10 10 倍青霉素-链霉素双抗 PBS,见 A.3。

5.2.1.2.11 细胞培养液,见 A.4。

5.2.1.2.12 病毒感染维持液,见 A.5。

5.2.1.2.13 坦布苏病毒的单抗 1F5,参见附录 B。

5.2.1.2.14 FITC-羊抗鼠 IgG 抗体。

5.2.1.3 样品

5.2.1.3.1 阴性对照

使用正常细胞上清液作为阴性对照。

5.2.1.3.2 阳性对照

使用坦布苏病毒 FX2010 株(CCTCC NO. V201032, 参见附录 C), 或其他背景清楚的鸭坦布苏病毒株作为阳性对照。

5.2.1.3.3 待检测样品

待检测的样品采集、处理、运输及保存, 参见附录 D。

5.2.1.4 试验步骤

5.2.1.4.1 DF-1 细胞的准备

同 5.1.1.3。

5.2.1.4.2 样品接种和培养

同 5.1.1.4。

5.2.1.4.3 免疫荧光鉴定

5.2.1.4.3.1 将细胞培养上清液弃去, 用 4% 多聚甲醛固定液于室温固定细胞 15 min, 每孔 0.5 mL。

5.2.1.4.3.2 轻轻吸弃固定液, 用无菌 PBS 洗涤 3 次, 每孔 0.5 mL, 每次 5 min。

5.2.1.4.3.3 加入 0.5% Triton X-100 通透 15 min, 每孔 0.5 mL; 轻轻吸弃通透液, 用 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。

5.2.1.4.3.4 加入含 1% BSA 的 PBS 溶液, 每孔 0.5 mL, 37℃ 封闭 1 h; 轻轻吸弃封闭液, 用无菌 PBS 洗涤 3 次, 每孔 0.5 mL, 每次 5 min。

5.2.1.4.3.5 加入 1:200 稀释的坦布苏病毒特异性单克隆抗体 1F5, 每孔 0.5 mL, 37℃ 孵育 1 h; 用 PBST 洗涤 3 次, 每孔 0.5 mL, 每次 5 min。

5.2.1.4.3.6 加入 1:500 稀释的 FITC-羊抗鼠荧光 IgG 抗体(按所购商品说明书稀释), 每孔 0.5 mL, 37℃ 孵育 1 h。

5.2.1.4.3.7 用 PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min; 用 PBS 洗涤 1 次后, 加入 PBS, 每孔 0.5 mL, 在荧光显微镜下观察特异性绿色荧光。

5.2.1.5 免疫荧光技术结果判定

5.2.1.5.1 试验成立的条件

在荧光显微镜下观察, 以阳性对照出现特异性绿色荧光, 而阴性对照无特异性绿色荧光为试验结果成立。

5.2.1.5.2 试验结果的判定

5.2.1.5.2.1 在试验成立的前提下, 细胞内有特异性的绿色荧光, 判定样品中坦布苏病毒为阳性。

5.2.1.5.2.2 在试验成立的前提下, 在荧光显微镜下观察, 若细胞内无特异性绿色荧光, 判定样品中坦布苏病毒为阴性。

5.2.2 RT-PCR 技术

5.2.2.1 仪器设备与耗材

5.2.2.1.1 可调移液器: 2 μ L、20 μ L、200 μ L、1 000 L。

5.2.2.1.2 台式高速冷冻离心机。

5.2.2.1.3 无 RNA 酶的 1.5 mL 管。

5.2.2.1.4 无 RNA 酶的 PCR 管。

5.2.2.1.5 无 RNA 酶的带滤芯枪头。

5.2.2.1.6 PCR 基因扩增仪。

5.2.2.1.7 核酸电泳仪。

5.2.2.1.8 核酸电泳槽。

5.2.2.1.9 凝胶成像分析系统。

5.2.2.2 试剂

5.2.2.2.1 商品化 RNA 提取试剂盒。

5.2.2.2.2 DEPC 处理水。

5.2.2.2.3 反转录试剂盒,包括随机引物、M-MLV 反转录酶、RNA 酶抑制剂。

5.2.2.2.4 PCR Mix(2X)。

5.2.2.2.5 dNTPs(2.5 mmol/L each)。

5.2.2.2.6 DNA Marker。

5.2.2.2.7 电泳级琼脂糖。

5.2.2.2.8 Tris-乙酸电泳缓冲液 TAE(50×TAE,1×TAE),见 A.6。

5.2.2.2.9 1%琼脂糖,见 A.7。

5.2.2.3 引物

5.2.2.3.1 随机反转录引物

Random 9 反转录引物。

5.2.2.3.2 RT-PCR 引物

针对坦布苏病毒 PrM 蛋白的 RT-PCR 检测引物,参见附录 E。

5.2.2.4 样品

5.2.2.4.1 阴性对照

阴性对照宜为正常细胞。

5.2.2.4.2 阳性对照

使用坦布苏病毒 FX2010 株(CCTCC NO. V201032,参见附录 C),或其他背景清楚的鸭坦布苏病毒株作为阳性对照。

5.2.2.4.3 待检测样品

待检测的样品采集、处理、运输及保存,参见附录 D。

5.2.2.5 试验步骤

5.2.2.5.1 病毒 RNA 的提取

按照 RNA 提取试剂盒操作说明书,提取待检组织样品总 RNA。提取的 RNA 应测定其浓度和纯度,并立即用于反转录,否则应于-80℃冰箱冻存。

5.2.2.5.2 病毒 cDNA 的合成

将 5 μL RNA 提取液与 2 μL Random 9 反转录引物混匀,70℃保温 10 min 后迅速冰浴 2 min;然后,分别加入 4 μL 5×M-MLV Buffer、1 μL RNA 酶抑制剂、1 μL M-MLV、1 μL dNTPs、6 μL DEPC 水,共 20 μL,混匀后 30℃保温 10 min,42℃保温 1 h~2 h,75℃ 15 min。

5.2.2.5.3 PCR 反应体系及反应条件

在试剂储存和准备区配制 PCR 反应液,在样品制备区进行加样。采用 25 μL 反应体系,组成如下:

2×PCR Mix	12.5 μL
-----------	---------

DTMUV - F 引物(10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$)	1.0 μL
DTMUV - R 引物(10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$)	1.0 μL
模板 cDNA	1.0 μL
灭菌去离子水	9.5 μL
总体积	25.0 μL

瞬时离心,置 PCR 基因扩增仪内进行扩增,反应程序为:95℃ 预变性 3 min;然后进入扩增循环:95℃ 30 s,53℃ 30 s,72℃ 30 s,30 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。

5.2.2.5.4 产物检测

在扩增产物分析区,将制备好的 1.0% 琼脂糖凝胶放入电泳槽(带加样孔的一端在阴极),倒入电泳液(1×TAE)浸过胶面。PCR 产物各取 10 μL 加入电泳胶孔内(先加 5 μL DNA Marker,然后依次加阴性对照产物,再加待测样品,最后加阳性对照产物),在 100 V 电压下电泳 15 min~30 min;在凝胶成像分析系统下观察、拍照,并记录结果。

5.2.2.6 RT-PCR 结果判定

5.2.2.6.1 试验成立的条件

阴性对照样品无条带,阳性对照样品出现 250 bp 大小的条带,则试验结果成立。

5.2.2.6.2 试验结果的判定

5.2.2.6.2.1 在试验成立的前提下,待检样品出现 250 bp 大小的条带,判定待检样品为坦布苏病毒 PCR 阳性。必要时,对扩增片段进行序列测定。

5.2.2.6.2.2 在试验成立的前提下,待检样品无条带,则为坦布苏病毒 PCR 阴性。

5.2.3 荧光 RT-PCR 技术

5.2.3.1 仪器设备与耗材

5.2.3.1.1 实时荧光定量 PCR 检测仪。

5.2.3.1.2 台式高速冷冻离心机。

5.2.3.1.3 涡旋振荡器。

5.2.3.1.4 可调移液器:2 μL 、20 μL 、200 μL 、1 000 μL 。

5.2.3.1.5 无 RNA 酶的 1.5 mL 离心管。

5.2.3.1.6 无 RNA 酶的荧光定量 PCR 管。

5.2.3.1.7 无 RNA 酶的带滤芯枪头。

5.2.3.2 试剂

5.2.3.2.1 商品化 RNA 提取试剂盒。

5.2.3.2.2 反转录试剂盒,包括随机引物、M-MLV 反转录酶、RNA 酶抑制剂。

5.2.3.2.3 实时荧光定量 PCR 试剂盒。

5.2.3.2.4 dNTPs(2.5 mmol/L each)。

5.2.3.2.5 DEPC 处理水。

5.2.3.3 样品

5.2.3.3.1 引物

5.2.3.3.1.1 特异反转录引物

针对坦布苏病毒的特异反转录引物,参见附录 C。

5.2.3.3.1.2 荧光 RT-PCR 引物和探针

针对坦布苏病毒 E 基因的荧光 RT-PCR 引物和探针,参见附录 E。

5.2.3.3.1.3 阴性对照

阴性对照为正常细胞或背景清楚的 SPF 鸭组织。

5.2.3.3.1.4 阳性对照

使用坦布苏病毒 FX2010 株(CCTCC NO. V201032, 参见附录 C), 或其他背景清楚的鸭坦布苏病毒株作为阳性对照。

5.2.3.4 试验步骤

5.2.3.4.1 病毒 RNA 的提取

同 5.2.2.5.1。

5.2.3.4.2 病毒 cDNA 的合成

使用针对坦布苏病毒的特异反转录引物(参见附录 E)进行反转录, 合成步骤同 5.2.2.5.2。

5.2.3.4.3 荧光 RT-PCR 反应体系及反应条件

在实验室洁净区域, 将试剂盒中预混液、引物和探针取出, 置于冰上直至融化。将下列试剂依次加入到无 RNA 酶的荧光定量 PCR 管中。采用 20 μL 反应体系, 组成如下:

2 $\times$ 荧光定量 PCR 预混液	10.0 μL
DTMUV - EF(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.8 μL
DTMUV - ER(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.8 μL
FXV probe(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.4 μL
无 RNA 酶去离子水	7.0 μL
总体积	19.0 μL

将上述加有反应液的荧光定量 PCR 管移至核酸提取区, 依次加入阴性对照、待检样品 cDNA 和阳性对照, 1 μL /管, 做好标记。瞬时离心, 打开荧光定量 PCR 仪和联机计算机, 将上述荧光 PCR 管置于荧光定量 PCR 仪内, 设置反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 然后进入扩增循环: 95 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 40 个循环。启动运行程序, 试验检测结束后, 根据收集的荧光曲线和 C_t 值判定结果。

5.2.3.5 荧光 RT-PCR 结果判定

5.2.3.5.1 试验成立的条件

阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整, 以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增曲线的最高点为准。阴性对照的检测结果应无特异性扩增; 阳性对照的 C_t 值应 <28.0 , 则试验结果成立。

5.2.3.5.2 试验结果的判定

5.2.3.5.2.1 C_t 值 ≤ 30 , 而且出现明显的扩增线, 表明样品中存在坦布苏病毒, 判为阳性。

5.2.3.5.2.2 无 C_t 值, 并且无扩增曲线, 或者 C_t 值 >35 , 表明样品中无坦布苏病毒, 判为阴性。

5.2.3.5.2.3 $30 < C_t$ 值 <35 的样品, 判为可疑, 必须重做。重做结果 C_t 值 <30 者为阳性, 否则判为阴性。

6 病毒特异性抗体检测

6.1 鸭坦布苏病毒 ELISA 抗体检测

6.1.1 耗材与仪器

6.1.1.1 可拆卸 ELISA 酶标板。

6.1.1.2 单道及多道微量移液器(配有吸头)。

6.1.1.3 加样槽。

6.1.1.4 酶标仪。

6.1.1.5 冰箱: 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 、-20 $^{\circ}\text{C}$ 、-80 $^{\circ}\text{C}$ 。

6.1.2 试剂

6.1.2.1 PBS, 见 A. 1。

6.1.2.2 包被液, 见 A. 8。

6.1.2.3 ELISA 洗涤液, 见 A. 2。

6.1.2.4 ELISA 封闭液, 见 A. 9。

6.1.2.5 ELISA 终止液(2mol/L), 见 A. 10。

6.1.2.6 ELISA 稀释液, 见 A. 11。

6.1.2.7 坦布苏病毒单抗 1F5, 参见附录 B。

6.1.3 试验步骤

6.1.3.1 抗原包被

将抗原(参见附录 F)用包被液稀释为 $0.75 \mu\text{g}/0.1 \text{ mL}$, 每孔加入 0.1 mL , $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 放置 $15 \text{ h} \sim 18 \text{ h}$, 之后用洗涤液洗涤 3 次, 每次 3 min 。

6.1.3.2 封闭

每孔加入新鲜配制的 0.2 mL 封闭液, 37°C 封闭 1 h , 洗涤液洗涤 3 次, 每次 3 min 。

6.1.3.3 血清稀释

阴性血清、阳性血清(参见附录 F)和待测血清用灭菌 PBS 稀释 10 倍。

6.1.3.4 抗原与待测血清的作用

将 $1:10$ 稀释好(稀释液见附录 A)的待测血清和对照血清分别加入酶标板中, 每孔 0.1 mL , 37°C 孵育 1 h ; 然后, 洗涤液洗涤 3 次, 每次 3 min 。

6.1.3.5 抗原与抗鸭坦布苏病毒单抗的作用

将抗鸭坦布苏病毒单抗(参见附录 B)稀释 40 倍, 加入酶标板中, 每孔 0.1 mL , 37°C 孵育 1 h ; 然后, 洗涤液洗涤 3 次, 每次 3 min 。

6.1.3.6 与二抗作用

用灭菌 PBS 将 0.8 mg/mL 的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体稀释 2 000 倍, 稀释好的酶标羊抗鼠 IgG 抗体加入酶标板中, 每孔 0.1 mL , 37°C 孵育 1 h ; 然后, 洗涤液洗涤 3 次, 每次 3 min 。

6.1.3.7 显色反应

加入 TMB 显色液, 每孔 0.1 mL , 室温, 避光显色 10 min 。

6.1.3.8 吸光度 OD_{450} 测定与阻断率计算

加入终止液, 0.05 mL/孔 , 终止反应, 酶标仪读取吸光度 OD_{450} 。按如下方法计算阻断率: 阻断率(%) = (阴性对照的吸光度 - 待测样品的吸光度) / 阴性对照的吸光度 $\times 100$ 。

6.1.4 ELISA 抗体检测结果判定

6.1.4.1 试验成立的条件

当阳性质控血清的阻断率 $\geq 50\%$, 判定试验结果成立。

6.1.4.2 试验结果的判定

6.1.4.2.1 当血清样品的阻断率值 $\geq 18.4\%$ 时, 该样品判定为鸭坦布苏病毒抗体阳性。

6.1.4.2.2 当血清样品的阻断率值 $\leq 12.6\%$ 时, 该样品判定为鸭坦布苏病毒抗体阴性。

6.1.4.2.3 当血清样品的阻断率值介于二者之间时, 判定为可疑, 重新检测仍小于 18.4% 判为鸭坦布苏抗体阴性。

6.2 鸭坦布苏病毒 HI 抗体检测

6.2.1 耗材与仪器

- 6.2.1.1 96孔U型微量板。
- 6.2.1.2 单道及多道微量移液器(配有吸头)。
- 6.2.1.3 加样槽。
- 6.2.1.4 湿盒。
- 6.2.1.5 振荡器冰箱:2℃~8℃、-20℃、-80℃。

6.2.2 试剂

- 6.2.2.1 BABS,见A.12。
- 6.2.2.2 硼酸氯化钠溶液,见A.12。
- 6.2.2.3 0.33%鹅红细胞悬液配制,见A.13。

6.2.3 HA效价测定

- 6.2.3.1 鸭坦布苏病毒血凝抑制试验抗原,参见附录G。
- 6.2.3.2 取鸭坦布苏病毒血凝抑制试验抗原样品,加入1mL BABS复原,待抗原完全融化成澄清液体后,进行HA效价测定。
- 6.2.3.3 采用96孔U型微量板进行试验,反应总体积为100 μL。从第1孔至第12孔,用移液器每孔加入BABS 50 μL,用移液器吸取被检样品 50 μL,从第1孔起,依次作2倍系列稀释,至第11孔,弃去移液器内50 μL液体,第12孔为不加样的红细胞对照孔,然后每孔加入0.33%的鹅红细胞。
- 6.2.3.4 立即在微量板振荡器上摇匀,放入湿盒,置37℃作用60 min,观察凝集反应。结果判定:当对照孔中的红细胞呈显著纽扣状时判定结果,以使红细胞完全凝集的最高稀释度作为判定终点。

6.2.4 HI效价测定

- 6.2.4.1 HA单位工作抗原液的制备。根据测定的血凝抑制试验抗原的HA效价,用BABS配制4个血凝单位的抗原。抗原配制完成应重新进行标定。
- 6.2.4.2 应用96孔U型微量板进行试验,反应总体积为100 μL。用BABS将处理好的血清(待检血清前处理方法参见附录H)作2倍稀释。
- 6.2.4.3 加入25 μL 4个血凝单位的抗原工作抗原,充分振荡后,置湿盒内2℃~8℃过夜。取出恢复至室温后,加入0.33%的鹅红细胞,混匀,放入湿盒,置37℃作用60 min,观察凝集反应。
- 6.2.4.4 试验设阴性血清对照、阳性血清对照、处理后的血清样品对照及红细胞对照。

6.2.5 HI抗体检测结果判定

6.2.5.1 试验成立的条件

当阳性对照血清出现明显的血凝抑制现象(红细胞于孔底呈扣状沉淀),对照阴、阳性血清的HI效价与已知效价相差不超过1个滴度时,试验结果成立。以使红细胞凝集被完全抑制的血清最高稀释度作为判定终点。

6.2.5.2 试验结果的判定

- 6.2.5.2.1 当出现2个孔以上血凝抑制(红细胞于孔底呈扣状沉淀)时,判为HI抗体抗性。
- 6.2.5.2.2 当与阴性对照血清一样,没有任何血凝抑制孔出现时,判为阴性。
- 6.2.5.2.3 当只出现1个孔有血凝抑制(红细胞于孔底呈扣状沉淀)时,判为可疑,需重复试验。如果不再有血凝抑制出现,则判为阴性;如果有2个孔以上血凝抑制,则判为阳性。

7 鸭坦布苏病毒病综合判定

- 7.1 根据发病鸭临床症状、病理变化和病毒分离结果可以对鸭坦布苏病毒病做出初步诊断的基础上,

经细胞免疫荧光、RT-PCR 和荧光 RT-PCR 3 种检测方法任选其一,检测结果为阳性,即可诊断为鸭坦布苏病毒病。

7.2 鸭坦布苏病毒 ELISA 抗体检测方法和 HI 抗体检测方法任选其一,检测结果为阳性,即可确定鸭群感染过鸭坦布苏病毒,或接种过疫苗。

以上所有试验过程均应采取措施,防止检测过程交叉污染,参见附录 I。

附 录 A

(规范性附录)

溶液试剂配制

A.1 磷酸盐缓冲液(PBS)(0.01 mol/L, pH 7.4)的配制

称取 8 g NaCl、0.2 g KCl、1.42 g Na_2HPO_4 、0.27 g KH_2PO_4 , 加入 0.8 L 去离子水溶解, 调 pH 至 7.4 后, 定容至 1 L。121℃ 高压灭菌后, 无菌分装。

A.2 PBST 洗涤液(ELISA 洗涤液)的配制

在 1 000 mL PBS 中加入 0.5 mL Tween-20, 混匀、分装备用。

A.3 含 10 倍双抗 PBS 的配制

在 90 mL PBS 中加入 10 mL 青霉素-链霉素溶液(1 万 U/mL), 混匀、分装备用。

A.4 细胞培养液

在 DMEM 培养液中加入 5% FBS、1% 双抗溶液(1 万 U/mL)和 L-谷氨酰胺(4.0 mmol/L)溶液, 用于 DF-1 细胞培养。

A.5 病毒感染维持液

在 DMEM 培养液中加入 2% FBS、1% 双抗溶液(1 万 U/mL)和 L-谷氨酰胺(4.0 mmol/L)溶液, 用于病毒感染后的细胞维持。

A.6 50×TAE 储存液配制

分别量取 $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 37.2 g、冰醋酸 57.1 mL、Tris·Base 242 g, 用一定量的灭菌去离子水溶解。充分混匀后, 加灭菌去离子水补齐至 1 000 mL。使用时, 取 20 mL 50×TAE 储存液, 加入 980 mL 去离子水, 制成 1×TAE 缓冲液。

A.7 1%琼脂糖

称取 1.0 g 琼脂糖, 倒入耐热玻璃三角瓶内, 再加入电泳缓冲液(1×TAE)100 mL, 轻轻混匀后加热, 使琼脂糖完全熔化。待琼脂糖胶温度降至 50℃~60℃, 加入核酸染料 5 μL , 轻轻混匀(不要产生气泡)。将其倒入制胶板, 插好电泳梳子。待胶完全凝固(30 min~60 min)之后, 将梳子拔出, 备用。

A.8 包被液(50 mmol/L)

称取 Na_2CO_3 1.59 g, NaHCO_3 2.93 g, 加入 990 mL 去离子水溶解, 调 pH 至 9.6, 用去离子水定容至 1 000 mL。

A.9 ELISA 封闭液

灭菌 PBS 100 mL, 加入 3 g 脱脂奶粉, 混匀。

A. 10 ELISA 终止液

量取去离子水 800 mL,向其中缓慢滴加 98%浓硫酸 108.7 mL,用去离子水定容至 1 000 mL,混匀。

A. 11 ELISA 稀释液

称取 KH_2PO_4 0.27 g, Na_2HPO_4 1.42 g, NaCl 8 g, KCl 0.2 g,溶于 900 mL 去离子水,加入 100 μL 硫柳汞,调 pH 至 7.2,用去离子水定容到 1 000 mL。用 0.22 μm 滤器除菌,无菌分装备用。用于稀释阻断用单抗、酶标羊抗鼠 IgG 抗体和各种血清。

A. 12 硼酸氯化钠缓冲液和 BABS

取硼酸 4.42 g,氯化钠 8.77 g,氢氧化钠 0.96 g,去离子水 1 000 mL,调 pH 为 9.0 形成硼酸氯化钠溶液。再取牛血清白蛋白 0.1 g,溶于硼酸氯化钠溶液 100 mL 成 BABS。

A. 13 0.33% 鹅红细胞悬液配制

A. 13.1 VAD 溶液:氯化钠 8.77 g,十二水合磷酸氢二钠 11.1 g,二水合磷酸二氢钠 24.96 g,去离子水 1 000 mL。

A. 13.2 鹅红细胞的制备:

A. 13.3 健康 2 月龄~36 月龄鹅 2 只~4 只,翅静脉采血,按 1:1 加入阿氏液抗凝。以 1 500 r/min 离心 5 min,去除阿氏液及白细胞。用 PBS(0.01 mol/L, pH 7.2)洗涤红细胞 2 次,每次以 1 500 r/min 离心 10 min,弃上清液,加入浓红细胞体积 10 倍以上的 PBS 摇匀,2℃~8℃静置存放,使用前配制成工作浓度。保存时间不超过 10 d。

A. 13.4 10%工作浓度的鹅红细胞悬液配制:静置存放的鹅红细胞使用前弃去上清液,重新加入 PBS 摇匀,以 1 500 r/min 离心 15 min,用 PBS 配制成 10%红细胞悬液。2℃~8℃存放,保存时间不超过 48 h。

A. 13.5 0.33%工作浓度的鹅红细胞悬液配制:静置存放的鹅红细胞使用前弃去上清液,重新加入 PBS 摇匀,以 1 500 r/min 离心 15 min,用 VAD 溶液配制成 0.33%浓度的红细胞悬液。2℃~8℃存放,保存时间不超过 48 h。

附 录 B

(资料性附录)

免疫荧光检测方法中所用坦布苏病毒的单抗

B.1 坦布苏病毒单抗的来源

鼠源单抗 1F5,由中国农业科学院上海兽医研究所制备并提交中国典型培养物保藏中心(简称 CCTCC),其保藏号为 CCTCC NO. C201220, CCTCC 地址为:湖北省武汉市武昌珞珈山(武汉大学)。该单抗可由中国农业科学院上海兽医研究所提供,对 100TCID₅₀ 鸭坦布苏病毒(FX2010)的中和效价 $\geq 1:10$ 。

B.2 坦布苏病毒单抗涉及的专利信息

该单抗涉及以下专利:

- a) 一种鸭黄病毒及其疫苗、试剂盒。专利号:CN 102533668A,专利公布日:2012.07.04。专利申请人:中国农业科学院上海兽医研究所。
- b) 抗鸭坦布苏病毒的单克隆抗体、杂交瘤细胞株及其应用。专利号:CN 102586193B,专利公布日:2013.06.19。专利申请人:中国农业科学院上海兽医研究所。

附 录 C
(资料性附录)
阳性对照病毒(FX2010)

C.1 FX2010 坦布苏病毒的来源

FX2010 坦布苏病毒,是一种鸭源病毒,由中国农业科学院上海兽医研究所分离并鉴定,保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),其保藏号为:CCTCC NO. V201032。该病毒由中国农业科学院上海兽医研究所提供,由 9 日龄 SPF 鸡胚接种病毒后,收集死亡胚体的研磨液后离心所得,病毒滴度 $>10^5$ TCID₅₀/mL。

C.2 FX2010 坦布苏病毒涉及的专利信息

该病毒株涉及以下专利:

一种鸭黄病毒及其疫苗、试剂盒。专利号:CN 102533668A,专利公布日:2012.07.04。专利申请人:中国农业科学院上海兽医研究所。

附录 D
(资料性附录)
样品的采集、处理、运输及保存

D.1 仪器设备与耗材

- D.1.1 生物样品均质研磨仪。
- D.1.2 台式高速冷冻离心机。
- D.1.3 低速大容量离心机。
- D.1.4 可调移液器:2 μ L、20 μ L、200 μ L、1 000 μ L。
- D.1.5 高压蒸汽灭菌器。
- D.1.6 无菌注射器:1 mL、5 mL。
- D.1.7 高压灭菌的剪刀、镊子。
- D.1.8 无菌离心管:1.5 mL、15 mL、50 mL。
- D.1.9 一次性洁净塑料自封袋。
- D.1.10 一次性手套、口罩、帽子。
- D.1.11 涡旋振荡器。
- D.1.12 无菌钢珠。
- D.1.13 冰箱:2℃~8℃、-20℃、-80℃。
- D.1.14 细胞培养箱。
- D.1.15 细胞培养瓶、12 孔细胞培养板。
- D.1.16 荧光显微镜。

D.2 样品采集

可采标 NY/T 541—2016。采样和样品前处理过程中应戴一次性手套、口罩、帽子,采样过程中样品不得交叉污染。

- a) 组织样品:采集死亡禽或发病禽的肺脏、脾脏、肾脏、卵巢(如有)等组织,采集病料时,用无菌的剪刀剪取组织样品(不同组织样品使用不同的无菌剪刀),将样品装入一次性灭菌的 50 mL 离心管或一次性洁净塑料自封袋,密封、编号,待检。
- b) 血清样品:用无菌注射器采血 1 mL 后,将其注入 1.5 mL 灭菌的 Eppendorf 管中,于 37℃ 静置 2 h。分离血清,将血清转入新的灭菌的 1.5 mL 离心管中,加盖、编号,待检。
- c) 细胞培养上清液:直接将细胞培养上清液加入到灭菌的 1.5 mL 离心管中,加盖、编号,待检。
- d) 鸡胚尿囊液:直接将鸡胚尿囊液加入到灭菌的 1.5 mL 离心管中,加盖、编号,待检。

以上在样品制备区进行。

D.3 样品处理**D.3.1 组织样品**

取待检组织样品 1.0 g~2.0 g,置于灭菌研钵中充分研磨,每克组织加入 1 mL 含 10×青霉素-链霉

素双抗 PBS 溶液,充分混合后转入离心管。或将组织置于特定的离心管中,按每克组织加入 1 mL 含 $10\times$ 青霉素-链霉素双抗 PBS 溶液和无菌钢珠,用高通量组织捣碎仪充分捣碎。经研磨或经组织捣碎仪捣碎的样品在 4°C 下 $10\,000\text{ r/min}$ 离心 10 min ,将上清液转入灭菌的 1.5 mL 离心管中,依据原样品的编号相应地编号。

D.3.2 血清、细胞培养上清液和鸡胚尿囊液

将血清或细胞培养物在 4°C 下 $10\,000\text{ r/min}$ 离心 10 min ,将上清液转入灭菌的 1.5 mL 离心管中,依据原样品的编号相应地编号。

D.4 样品运输与保存

将上述采集的样品放入密封的塑料袋内(一个采样点的样品放一个塑料袋),于保温箱中加冰袋、密封,送实验室检测。经上述处理的样品,在 $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 条件下保存应不超过 24 h ;若需长期保存,应放在 -80°C 冰箱中,且应避免反复冻融(冻融不超过 3 次)。

附录 E (资料性附录)

坦布苏病毒特异反转录引物、RT-PCR、荧光 RT-PCR 的引物和探针

E.1 坦布苏病毒的特异反转录引物

FXV-RT primer; 5'-ATCTCTGTGATGCYCC-3' (序列中含有的简并碱基 Y=T/C)。

E.2 坦布苏病毒 RT-PCR 检测引物

见表 E.1。

表 E.1 坦布苏病毒 RT-PCR 检测引物

引物名称	引物序列(5'→3',上下两行分别为上下游引物序列)*	产物大小, bp	基因	用途
DTMUV-F	AGACTGCTGGTGCAATGARAC	250	PrM	RT-PCR
DTMUV-R	CGTCGTTCCCARRTTCCA			
* 序列中含有的简并碱基 R=A/G。				

E.3 坦布苏病毒荧光 RT-PCR 检测用引物和探针

见表 E.2。

表 E.2 荧光 RT-PCR 检测用引物和探针

引物名称	引物序列(5'→3',上下两行分别为上下游引物序列)*	产物大小, bp	基因	用途
DTMUV - EF	TGTCTTATGCAGGTACYGATG	115	E	荧光 RT - PCR
DTMUV - ER	CGTATGGGTTGACTGTTATCA			
FXV probe	[FAM]- AGTTC CATATCCATGTC-[TAMRA]			
* 序列中含有的简并碱基 Y=T/C。				

E.4 引物和探针的稀释

开盖前, 将新合成的引物或探针进行短暂离心(12 000 r/min, 30 s); 用 DEPC 处理的灭菌去离子水溶解, 加水量为 10×总纳摩尔数(例如, 合成引物或探针 1 OD, 4.5 nmol, 则加水量为 10×4.5=45 μL), 充分混匀, 此时引物或探针的浓度为 100 μmol/L, 可作为储存液, -20℃或-20℃以下保存; 使用时, 将 100 μmol/L 的引物或探针储存液用 DEPC 处理的灭菌去离子水进行 10 倍稀释, 配制浓度为 10 μmol/L 的引物或探针使用液, -20℃或-20℃以下保存。

E.5 荧光 RT-PCR 引物及探针涉及的专利信息

一种鸭黄病毒及其疫苗、试剂盒。专利号: CN 102533668A, 专利公布日: 2012.07.04。专利申请人: 中国农业科学院上海兽医研究所。

本标准中所用的荧光 RT-PCR 引物和探针在上述专利的基础上做了简并引物的优化。

附录 F
(资料性附录)
ELISA 抗原和血清标准

F.1 ELISA 包被抗原质量标准

本品系用鸭坦布苏病毒 FX2010 株接种 DF-1 细胞或其他敏感细胞,36 h~48 h 收获感染细胞的上清液,用 2% 甲醛灭活,超速离心纯化的病毒抗原, -15℃ 以下保存。用于鸭坦布苏病毒 ELISA 抗体检测。

【性状】15℃ 以下,无色或淡粉色固体,室温下可融化。

【无菌检验】按现行《中国兽药典》附录方法进行检验,应无菌生长。

【效价测定】每毫升总蛋白不低于 0.5 mg(相当于不低于 $10^{7.5}$ TCID₅₀/mL 病毒的蛋白)。

【作用与用途】用于鸭坦布苏病毒 ELISA 抗体检测。

【规格】1 mL/管。

【储藏与有效期】-15℃ 以下保存,有效期 12 个月。

F.2 阳性血清质量标准

本品系用鸭坦布苏病毒 FX2010 株感染 4 周龄~8 周龄的 SPF 鸭,感染后 3 周采血,分离血清, -15℃ 以下保存。用于鸭坦布苏病毒 ELISA 抗体检测。

【性状】-15℃ 以下,淡黄色固体,室温下可融化。

【无菌检验】按现行《中国兽药典》附录方法进行检验,应无菌生长。

【效价测定】用中和试验测定,对 100 ELD₅₀ 鸭坦布苏病毒 FX2010 株的中和效价不低于 5。

【特异性】将种毒 FX2010 株用灭菌 PBS 稀释至每 0.05 mL 含 100 TCID₅₀,与等体积阳性血清混合,在 37℃ 中和 1 h。接种生长良好的 DF-1 细胞的 96 孔细胞培养板,接种 10 孔,每孔 0.1 mL。在 37℃ 作用 1 h 后,每孔加入含 5% 小牛血清的 DMEM 0.1 mL,在 37℃、含 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 5 d,观察并记录细胞病变(CPE)。同时设病毒对照和 PBS 对照,各接种 10 孔。病毒对照孔应产生 CPE,而中和孔与 PBS 对照孔应无 CPE 出现。

【作用与用途】用于鸭坦布苏病毒 ELISA 抗体检测。

【规格】0.2 mL/管。

【储藏与有效期】-15℃ 以下保存,有效期 12 个月。

F.3 阴性血清质量标准

本品系用 SPF 鸭蛋孵化的鸭,在隔离器中饲养至 4 周龄~8 周龄,采血,分离血清, -15℃ 以下保存。用于鸭坦布苏病毒 ELISA 抗体检测。

【性状】-15℃ 以下,淡黄色固体,室温下可融化。

【无菌检验】按现行《中国兽药典》附录方法进行检验,应无菌生长。

【效价测定】用中和试验测定,对 100 ELD₅₀ 鸭坦布苏病毒 FX2010 株的中和效价不高于 1:2。

【作用与用途】用于鸭坦布苏病毒 ELISA 抗体检测。

【规格】0.2 mL/管。

【储藏与有效期】-15℃ 以下保存,有效期 12 个月。

附 录 G

(资料性附录)

鸭坦布苏病毒血凝抑制试验抗原

G.1 血凝抑制抗原来源

系用鸭坦布苏病毒(Duck Tembusu Virus)HB株(简称DTMUV-HB株)脑内接种乳鼠培养,收获感染脑组织,匀浆,蔗糖-丙酮处理,经甲醛灭活后,加冻干保护剂,真空冷冻干燥制成。用于鸭坦布苏病毒HI抗体的检测。

G.2 涉及的专利信息

该血凝抑制抗原的处理方法涉及以下专利:

一种鸭坦布苏病毒病血凝抑制试验抗原及其制备方法。专利号:CN 201610096524.4,专利公布日:2016.07.27。专利申请人:北京市农林科学院。

附录 H

(资料性附录)

HI 抗体检测的鸭血清处理方法

H.1 待用于 HI 抗体检测的鸭血清处理方法

H.1.1 25%白陶土配制:白陶土 25 g,硼酸氯化钠溶液 100 mL,充分摇匀。

H.1.2 血清 100 μ L,400 μ L 25%白陶土。

H.1.3 剧烈振荡血清-白陶土混合物,每 5 min 振荡一次,共 20 min。

H.1.4 1 500 r/min 离心,20 min。

H.1.5 加入 100 μ L 10%鹅红细胞悬液。

H.1.6 每隔 5 min 轻轻摇动上层清液,使红细胞保持悬浮状态,共 20 min。

H.1.7 800 g 离心 10 min,红细胞沉积于白陶土上层。

H.1.8 将上清液移入新管中,此液体视为 1:5 稀释的待检血清。

H.2 HI 抗体检测方法涉及的专利信息

该 HI 抗体检测方法涉及以下专利:

一种鸭坦布苏病毒病疫苗的效力检验方法。专利号:CN 201610169370.7,专利公布日:2017.05.24。专利申请人:北京市农林科学院。

附录 I

(资料性附录)

检测过程防止交叉污染的措施

I.1 制样过程

制样工具应清洗干净,121℃高压灭菌 20 min,一套洁净工具限于一份样品使用。存放样品的容器应经过清洗、高压,或为一次性灭菌容器。

I.2 检测过程

I.2.1 PCR 实验室应分为样品制备区、前 PCR 区、PCR 区和后 PCR 区。将模板提取、PCR 反应液配制、PCR 循环扩增及 PCR 产物的鉴定等步骤分区或分室进行。实验室的运作应从“洁净区”到“污染区”单向进行。

I.2.2 实验过程中,必须穿戴实验服和手套,手套要经常更换。各区要有专用实验服,经常清洗。

I.2.3 各区所有的试剂、器材(尤其是移液器)、仪器都应专用,不得带出该区。

I.2.4 所有溶液、水、耗材和器具应 121℃高压下蒸汽灭菌 20 min,避免核酸和/或核酸酶污染。每种溶液应使用高质量的成分和新蒸馏的双蒸水。在 20℃~25℃储存的试剂中,可加入 0.025%的叠氮钠。所有试剂应以大体积配制,然后分装成仅够一次使用的量进行储存。

I.2.5 DNA 模板或引物的离心管打开之前,要短暂离心。离心管不能用力崩开,以免产生气溶胶。

I.2.6 前 PCR 区中,应在 PCR 操作台中加入 PCR 反应各组分。

I.2.7 实验前后,实验室用紫外线消毒以破坏残留的 DNA。

I.2.8 可使用 dUTP/UDG 法控制污染。

I.2.9 应遵循 PCR 操作的其他要求:WS/T 230—2002,6 污染的预防和控制。