ICS 11.220
B 41

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 544—2015
代替 NY/T 544—2002

猪流行性腹泻诊断技术

Diagnostic techniques for porcine epidemic diarrhea

郑州中道生物技术有限公司(仅供下载)
www.hnzdsw.com 03715789961

2015-05-21 发布　　2015-08-01 实施

中华人民共和国农业部 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 544—2002《猪流行性腹泻诊断技术》。

本标准与 NY/T 544—2002 相比，病原检测部分增加了 RT-PCR 检测方法。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位：中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

本标准主要起草人：冯力、陈建飞、时洪艳、张鑫。

本标准的历次版本发布情况为：

——NY/T 544—2002。

郑州中道生物技术有限公司（仅供下载）
www.hnzdsw.com
0371-67896961

猪流行性腹泻诊断技术

1 范围

本标准规定了猪流行性腹泻的病原学检测和血清学检测。病原学检测包括病毒分离与鉴定、直接免疫荧光法、双抗体夹心酶联免疫吸附试验和反转录—聚合酶链式反应。血清学检测包括血清中和试验和间接酶联免疫吸附试验。

本标准适用于对猪流行性腹泻的诊断、产地检疫及流行病学调查等。

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/T 6682 分析实验室用水规格和实验方法

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

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

猪流行性腹泻 *porcine epidemic diarrhea*，PED

猪流行性腹泻是由尼多目(*Nidovirales*)、冠状病毒科(*Coronaviridae*)、α-冠状病毒属的猪流行性腹泻病毒(*porcine epidemic diarrhea virus*，PEDV)引起的猪的一种高度接触传染性的肠道疾病，以呕吐、腹泻、脱水和哺育仔猪高死亡率为主要特征。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CPE：cytopathic effect 细胞病变作用。

DIA：direct immunofluorescence assay 直接免疫荧光法。

ELISA：enzyme-linked immunosorbent assay 酶联免疫吸附试验。

PBS：phosphate buffered saline 磷酸盐缓冲液。

PED：porcine epidemic diarrhea 猪流行性腹泻。

PEDV：porcine epidemic diarrhea virus 猪流行性腹泻病毒。

RT-PCR：teverse transcription-polymerase chain reaction 反转录—聚合酶链式反应。

5 临床诊断

5.1 流行特点

本病一年四季均可发生，主要发生在每年的12月到翌年的3月，有时也发生于夏季、秋季。各种年龄的猪均可感染，尤其是1周龄内的哺乳仔猪，发病率和死亡率可高达100%。病猪、带毒猪和隐性感染猪是本病的主要传染源。病毒通过粪—口途径或感染母猪的乳汁进行传播。

5.2 临床症状

病猪首先表现为呕吐，多发生在吮乳或吃食后，吐出的胃内容物呈黄色或乳白色。随后出现水样腹

郑州中道生物技术有限公司（仅供下载）
0371-67896961
www.hnzdsw.com

泻，腹泻物呈灰黄色、灰色，或呈透明水样，顺肛门流出，沾污臀部。表现脱水、眼窝下陷，行走蹒跚，精神沉郁，食欲减退或停食。症状与年龄大小有关，年龄越小症状越重。1 周龄以内的仔猪在发生腹泻3 d～4 d后，常因严重脱水而死亡。断乳猪、育肥猪以及母猪症状较哺乳仔猪轻，表现精神不振、厌食，持续腹泻 4 d～7 d 后逐渐恢复正常，少数猪生长发育不良。成年猪表现为厌食和腹泻，个别表现为呕吐。

5.3 病理变化

肉眼可见的病理变化只限于小肠，可见小肠膨胀，肠壁变薄，外观明亮，肠管内有黄色或灰色液体或带有气体。肠系膜充血及肠系膜淋巴结肿大。组织学检查可见，小肠绒毛细胞的空泡形成和脱落，肠绒毛萎缩、变短，绒毛高度与隐窝深度从正常的 7∶1 降低为 3∶1。超微结构的变化，主要发生在肠细胞的胞浆，可见细胞器的减少，产生电子半透明区，微绒毛终末网消失。细胞变得扁平。细胞脱落，进入肠腔。在结肠也可见到细胞变化，但未见到脱落。

6 实验室诊断

6.1 病毒分离与鉴定

6.1.1 仪器、材料与试剂

除特别说明以外，本标准所用试剂均为分析纯，水为符合 GB/T 6682 规定的灭菌双蒸水或超纯水。

倒置显微镜、冷冻离心机、微孔滤器、细胞培养瓶、盖玻片、温箱等。Vero 细胞系、仔猪空肠内容物及小肠内容物或粪便。磷酸盐缓冲液(PBS)、细胞培养液、病毒培养液、N-2-羟乙基哌嗪-N′-2-乙烷磺酸(HEPES)液(配制方法见附录 A)。

6.1.2 病毒分离

将采集的小段空肠连同肠内容物或粪便用含 1 000 IU/mL 青霉素、1 000 μg/mL 链霉素的 PBS 制成 5 倍悬液，在 4℃条件下 3 000 r/min 离心 30 min，取上清液，经 0.22 μm 微孔滤膜过滤，分装，立即使用或置－20℃保存备用。将过滤液(病毒培养液的 10%)接种于 Vero 细胞单层上，同时加过滤液量 50%的病毒培养液，37℃吸附 1 h。根据组织培养瓶大小添加病毒培养液至病毒培养总量，置 37℃培养，逐日观察 3 d～4 d，按致细胞病变作用(CPE)变化情况，可盲传 2 代～3 代。

6.1.3 结果判定

CPE 变化的特点是细胞面粗糙、颗粒增多，有多核细胞(7 个～8 个甚至几十个)，并可见空斑样小区，细胞逐渐脱落。这是特征性的 CPE，可与猪传染性胃肠炎(TGE)病毒的 CPE 相区别。同时，在细胞培养瓶中加盖玻片，收毒后用直接荧光做鉴定试验。有条件时可进行电镜观察，用负染法在阳性样品中电镜观察，可见到冠状病毒粒子。

6.2 直接免疫荧光法

6.2.1 仪器、材料与试剂

除特别说明以外，本标准所用试剂均为分析纯，水为符合 GB/T 6682 规定的灭菌双蒸水或超纯水。

荧光显微镜、冷冻切片机、载玻片、盖玻片、温箱、滴管等。荧光抗体(FA)、急性期内(5 d～7 d)患猪空肠中段的黏膜上皮或肠段。磷酸盐缓冲液(PBS)、0.1%伊文思蓝原液、磷酸盐缓冲甘油(配制方法见附录 B)。

6.2.2 标本片的制备

6.2.2.1 组织标本

采急性期内(5 d～7 d)患猪空肠中段的黏膜上皮做涂片或肠段做冷冻切片(4 μm～7 μm)，丙酮中固定 10 min，置于 PBS 中浸泡 10 min～15 min，风干或自然干燥。

6.2.2.2 细胞培养盖玻片

将分离毒细胞培养 24 h～48 h 的盖玻片及阳性、阴性对照片在 PBS 中冲洗数次，放入丙酮中固定 10 min，再置于 PBS 中浸泡 10 min～15 min，风干。

郑州牧生物科技有限公司（仅供下载）
www.zzmsw.com 0371-67836961

6.2.3 FA 染色

用 0.02%伊文思蓝原液将 FA 稀释至工作浓度(1∶8 以上合格)。4 000 r/min 离心 10 min,取上清液滴于标本上。37℃恒温恒湿染色 30 min,用 PBS 冲洗 3 次,依次为 3 min、4 min、5 min,风干,滴加磷酸盐缓冲甘油,盖玻片封固,荧光显微镜检查。

6.2.4 结果判定

判定标准:在荧光显微镜下检查,被检标本的细胞结构应完整清晰,并在阳性、阴性对照均成立时判定。在胞浆中见到特异性苹果绿色荧光判定为阳性,如所有细胞浆中无特异性荧光判定为阴性。

可根据细胞内荧光亮度强、弱分别做如下记录:

a) ++++:呈闪亮苹果绿色荧光;

b) +++:呈明亮苹果绿色荧光;

c) ++:呈一般苹果绿色荧光;

d) +:呈较弱绿色荧光;

e) −:呈红色。

结果为 a)～d)者均判为阳性。

6.3 双抗体夹心 ELISA

6.3.1 仪器、材料与试剂

除特别说明以外,本标准所用试剂均为分析纯,水为符合 GB/T 6682 规定的灭菌双蒸水或超纯水。

定量加液器、微量移液器及配套吸头、96 孔或 40 孔聚乙烯微量反应板、酶标测试仪。猪抗 PED-IgG、猪抗 PED-IgG-HRP(HRP 为辣根过氧化物酶)、发病仔猪粪便或肠内容物。洗液、包被稀释液、样品稀释液、酶标抗体稀释液、底物溶液、终止液(配制方法见附录 C)。

6.3.2 操作方法

将发病仔猪粪便或肠内容物用浓盐水 1∶5 稀释,3 000 r/min 离心 20 min,取上清液待检。

6.3.2.1 冲洗包被板

向各孔注入无离子水,浸泡 3 min 甩干,重复 3 次,甩干孔内残液,在滤纸上吸干。

6.3.2.2 包被抗体

用包被稀释液稀释猪抗 PED-IgG 至使用倍数,每孔加 100 μL,置于 4℃过夜,弃液,用洗液冲洗 3 次,每次 3 min。

6.3.2.3 加样品

将被检样品用样品稀释液(见附录 C.3)做 5 倍稀释,加入两孔,每孔 100 μL,每块反应板设阴性抗原、阳性抗原及稀释液对照各两孔。置于 37℃作用 2 h,弃样品,冲洗同 6.3.2.2。

6.3.2.4 加酶标记抗体

每孔加 100 μL 经酶标抗体稀释液稀释至使用浓度的猪抗 PED-IgG-HRP,置于 37℃ 2 h,弃液,冲洗同 6.3.2.2。

6.3.2.5 加底物溶液

每孔加新配置的底物溶液 100 μL,置于 37℃ 30 min。

6.3.2.6 终止反应

每孔加终止液 50 μL,置于室温 15 min。

6.3.3 结果判定

用酶标测试仪在波长 492 nm 下测定吸光度(OD)值。阳性抗原对照两孔平均 OD 值>0.8,阴性抗原对照两孔平均 OD 值≤0.2 为正常反应。按以下两个条件判定结果:P/N 值≥2,且被检抗原两孔平均 OD 值≥0.2 判为阳性,否则为阴性。

注:P 为阳性孔的 OD 值,N 为阴性对照孔的 OD 值。

郑州中普生物技术有限公司(仅供下载) www.hnzdsw.com 0371-67896961

6.4 RT-PCR

6.4.1 仪器、材料与试剂

除特别说明以外，本标准所用试剂均为分析纯，水为符合 GB/T 6682 规定的灭菌双蒸水或超纯水。

PCR 扩增仪、1.5 mL 离心管、0.2 mL PCR 反应管、电热恒温水槽、台式高速低温离心机、电泳仪、微量移液器及配套吸头、微波炉、紫外凝胶成像仪、冰箱。TRIzol® 试剂、核糖核酸酶(RNase)抑制剂(40 U/μL)、反转录酶(M-MLV)(200 U/μL)、dNTPs 混合物(各 10 mM)、无 RNase dH_2O、EmeraldAmp™ PCR Master Mix(2×)、DL2 000 DNA Marker、10×或 6×DNA 上样缓冲液、PBS(配制方法见附录 A)、TAE 电泳缓冲液(配制方法见附录 D)、三氯甲烷、异丙醇、三羟甲基氨基甲烷(Tris 碱)、琼脂糖、乙二胺四乙酸二钠(Na_2EDTA)、冰乙酸、氯化钠、溴化乙锭、灭菌双蒸水。

6.4.2 引物

6.4.2.1 反转录引物(ORF3RL)

5′-GGTGACAAGTGAAGCACAGA-3′；

引物贮存浓度为 10 μmol/L，使用时终浓度为 500 pmol/L。

6.4.2.2 PCR 反应引物

上游引物(ORF3U)：5′-CCTAGACTTCAACCTTACGA-3′；

下游引物(ORF3L)：5′-CAGGAAAAAGAGTACGAAAA-3′；

引物贮存浓度为 10 μmol/L，使用时终浓度为 200 pmol/L。

6.4.3 样品制备

将小肠内容物或粪便与灭菌 PBS 按 1∶5 的重量体积比制成悬液，在涡旋混合器上混匀后 4℃ 5 000 r/min离心 10 min，取上清液于无 RNA 酶的灭菌离心管中，备用。制备的样品在 4℃保存时不应超过 24 h，长期保存应分装成小管，置于−70℃以下，避免反复冻融。

6.4.4 病毒总 RNA 提取

取 6.4.3 制备的待检样品上清 300 μL 于无 RNA 酶的灭菌离心管(1.5 mL)中，加入 500 μL RNA 提取液(TRIzol® Reagent)，充分混匀，室温静置 10 min；加入 500 μL 三氯甲烷，充分混匀，室温静置 10 min，4℃ 12 000 r/min 离心 10 min，取上清(500 μL)于新的离心管(1.5 mL)中，加入 1.0 mL 异丙醇，充分混匀，−20℃静置 30 min，4℃ 12 000 r/min 离心 10 min。小心弃上清，倒置于吸水纸上，室温自然风干。加入 20 μL 无 RNase dH_2O 溶解沉淀，瞬时离心，进行 cDNA 合成或置于−70℃以下长期保存。若条件允许，病毒总 RNA 还可用病毒 RNA 提取试剂盒提取。

6.4.5 cDNA 合成

反应在 20 μL 体系中进行。取 6.4.4 制备的总 RNA 12.5 μL 于无 RNA 酶的灭菌离心管(1.5 mL)中，加入 1 μL 反转录引物(ORF3RL)混匀，70℃保温 10 min 后迅速在冰上冷却 2 min，瞬时离心使模板 RNA/引物混合液聚集于管底；然后，依次加入 4 μL 5×M-MLV 缓冲液、1 μL dNTPs 混合物(各 10 mmol/L)、0.5 μL RNase 抑制剂、1.0 μL 反转录酶 M-MLV 混匀，42℃保温 1 h；最后，70℃保温 15 min 后冰上冷却，得到 cDNA 溶液，立即使用或置于−20℃保存。

6.4.6 PCR 反应

6.4.6.1 反应体系(25 μL)

2×EmeraldAmp™ PCR Master Mix	12.5 μL
ORF3U	0.5 μL
ORF3L	0.5 μL
模板(cDNA)	2 μL
无菌双蒸水加至	25 μL

PCR 反应时，要设立阳性对照和空白对照。阳性对照模板为猪流行性腹泻病毒 ORF3 基因重组质

郑州中通生物技术有限公司(仅供下载) www.hnzts.com 0371-67896961

粒，空白对照模板为提取的总 RNA。

6.4.6.2 PCR 反应程序

94℃预变性 5 min，然后 30 个循环（98℃变性 10 s、55℃退火 30 s、72℃延伸 50 s），最后 72℃延伸 7 min，4℃保存。

6.4.7 电泳

6.4.7.1 制胶

1%琼脂糖凝胶板的制备：将 1 g 琼脂糖放入 100 mL 1×TAE 电泳缓冲液中，微波炉加热融化。待温度降至 60℃左右时，加入 10 mg/mL 溴化乙锭（EB）5 μL，均匀铺板，厚度为 3 mm～5 mm。

6.4.7.2 加样

PCR 反应结束后，取 5 μL 扩增产物（包括被检样品、阳性对照、空白对照）、5 μL DL2 000 DNA Marker 进行琼脂糖凝胶电泳。

6.4.7.3 电泳条件

150 V 电泳 10 min～15 min。

6.4.7.4 凝胶成像仪观察

反应产物电泳结束后，用凝胶成像仪观察检测结果、拍照、记录试验结果。

6.4.8 PCR 结果判定

各被检样品在同一块凝胶板上电泳后，当 DNA 分子质量标准、各组对照同时成立时，被检样品电泳道出现一条 774 bp 的条带，判为阳性（+）；被检样品电泳道没有出现大小为 774 bp 的条带，判为阴性（－）。结果判定参见附录 D 图 D.1。

6.5 血清中和试验

6.5.1 仪器、材料与试剂

除特别说明以外，本标准所用试剂均为分析纯，水为符合 GB/T 6682 规定的灭菌双蒸水或超纯水。

微量移液器及配套吸头、96 孔微量平底反应板、二氧化碳培养箱或温箱、倒置显微镜、微量振荡器、小培养瓶等。Vero 细胞系、病毒抗原和标准阴性血清、阳性血清、指示毒（毒价测定后立即小量分装，－30℃冻存，避免反复冻融，使用剂量为 500 $TCID_{50}$～1 000 $TCID_{50}$）、同头份的健康（或病初）血清和康复 3 周后的双份被检血清或单份血清。稀释液、细胞培养液、病毒培养液、HEPES 液。

6.5.2 操作方法

用稀释液倍比稀释血清，每份血清加 4 孔，每孔 50 μL，再分别加 50 μL 指示毒。经微量振荡器震荡 1 min～2 min，置于 37℃中和 1 h。每孔加细胞悬液 100 μL（2×10^5 个细胞/mL～3×10^5 个细胞/mL），微量板置于 37℃、二氧化碳培养箱或用胶带封口置于 37℃温箱培养，72 h～96 h 判定结果。设阴性对照、阳性对照，病毒对照和细胞对照，阴性血清与待检血清同倍稀释，阳性血清做 2^{-6} 稀释。

6.5.3 结果判定

当病毒抗原及阴性血清对照组均出现 CPE，阳性血清及细胞对照组均无 CPE 时，试验成立。以能抑制 50%以上细胞出现 CPE 的血清最高稀释度的倒数判定为该血清 PED 抗体效价的滴度。

血清中和抗体效价 1∶8 以上为阳性反应；1∶4 为疑似反应；小于 1∶4 为阴性反应。疑似血清复检一次，仍为可疑时，则判为阴性。

发病后 3 周以上的康复血清滴度是健康（或病初）血清滴度的 4 倍或以上，判为阳性反应。

6.6 间接 ELISA

6.6.1 仪器、材料与试剂

除特别说明以外，本标准所用试剂均为分析纯，水为符合 GB/T 6682 规定的灭菌双蒸水或超纯水。

定量加液器、微量移液器及配套吸头、96 孔或 40 孔聚乙烯微量反应板、酶标测试仪等。

抗原和酶标抗体。磷酸盐缓冲液、包被稀释液、样品稀释液、酶标抗体稀释液、底物溶液及终止液。

郑州中农科技有限公司（仅供下载） 0371-67896961 www.nnzds.com

6.6.2 操作方法

6.6.2.1 冲洗包被板

向各孔注入无离子水，浸泡 3 min，甩干，重复 3 次。甩干孔内残液，在滤纸上吸干。

6.6.2.2 抗原包被

用包被稀释液稀释抗原至使用浓度，包被量为每孔 100 μL，置于 4℃冰箱湿盒内过夜。弃掉包被液，用冲洗液洗 3 次，每次 3 min。

6.6.2.3 加被检及对照血清

将每份被检血清样品用血清稀释液做 1∶100 稀释，加入两个孔，每孔 100 μL。每块反应板设阳性、阴性血清及稀释液对照各两孔，每孔 100 μL，盖好包被板置 37℃湿盒内 1 h，冲洗同 6.6.2.2。

6.6.2.4 加酶标抗体

用酶标抗体稀释液将酶标抗体稀释至使用浓度，每孔加 100 μL，置于 37℃湿盒内 1 h，冲洗同 6.6.2.2。

6.6.2.5 加底物溶液

每孔加新配制的底物溶液 100 μL，在 37℃湿盒内反应 5 min～10 min。

6.6.2.6 终止反应

每孔加终止液 50 μL。

6.6.3 结果判定

6.6.3.1 目测法

阳性对照血清孔呈鲜明的橘黄色，阴性对照血清孔无色或基本无色，被检血清孔凡显色者即判抗体阳性。

6.6.3.2 比色法

用酶标测试仪，在波长 492 nm 下，测定各孔 OD 值。阳性对照血清的两孔平均 OD 值＞0.6，阴性对照血清的两孔平均 OD 值≤0.162 为正常反应，OD 值≥0.200 为阳性；OD 值为 0.200～0.400 时判为“＋”；0.400～0.800 判为“＋＋”；OD 值＞0.800 判为“＋＋＋”；OD 值在 0.163～0.200 之间为疑似；OD 值＜0.163 为“－”。对疑似样品可复检一次，复检结果如仍为疑似范围，则看 P/N 比值，P/N 比值≥2 判为阳性，P/N 比值＜2 者判为阴性。

7 结果判定

只要实验室诊断中的任何一种方法的结果成立，即可判断该病为猪流行性腹泻。

郑州中牧生物技术有限公司（仅供下载）
www.hnzmsw.com 0371-67896961

附 录 A
（规范性附录）
溶 液 的 配 制

A.1 0.02 mol/L pH 7.2 磷酸盐缓冲液(PBS)的配制

A.1.1 0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液：称取磷酸氢二钠($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)71.64 g，先加适量无离子水溶解，最后定容至 1 000 mL，混匀。

A.1.2 0.2 mol/L 磷酸二氢钠溶液：称取磷酸二氢钠($NaH_2PO_4 \cdot 12H_2O$)31.21 g，先加适量无离子水溶解，最后定容至 1 000 mL，混匀。

A.1.3 量取 0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液 360 mL，0.2 mol/L 磷酸二氢钠溶液 140 mL，称取氯化钠 38 g，用无离子水溶解至稀释至 5 000 mL，4℃保存。

A.2 细胞培养液的配制

含 10%灭活犊牛血清的 1640 营养液，加 100 IU/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素，用 5.6%碳酸氢钠($NaHCO_3$)调 pH 至 7.2。如需换液，则血清含量为 5%。

A.3 病毒培养液的配制

1640 培养液中加下列成分，使最终浓度各达到：

1%二甲基亚砜(DMSO)；

5 μg/mL～10 μg/mL 胰酶；

100 IU/mL 青霉素；

100 μg/mL 链霉素；

以 5.6%碳酸氢钠($NaHCO_3$)调节 pH 至 7.2。

A.4 HEPES 液的配制

称取 0.238 5 g HEPES 溶于 100 mL 无离子水中，用 1 mol/L 氢氧化钠(NaOH)调节 pH 至 7.0～7.2，过滤后置 4℃备用。

郑州中道生物技术有限公司（仅供下载）
www.hnzdsw.com
0371-67890961

附 录 B
（规范性附录）
直接荧光抗体法溶液的配制

B.1 0.1%伊文斯蓝原液的配制

称取伊文斯蓝 0.1 g 溶于 100 mL 0.02 mol/L pH 7.2 的 PBS 中，4℃保存。使用时，稀释成 0.02% 的浓度。

B.2 磷酸盐缓冲甘油的配制

量取丙三醇 90 mL，0.02 mol/L pH 7.2 的 PBS 10 mL，振荡混合均匀即成，4℃保存。

郑州中道生物技术有限公司（仅供下载）
www.hnzdsw.com
0371-67896961

附 录 C
（规范性附录）
双抗体夹心 ELISA 溶液的配制

C.1 洗液的配制

量取 50 μL 吐温-20，加入 100 mL 0.02 mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲液（见 A.1）中。

C.2 包被稀释液的配制

C.2.1 0.1 mol/L pH9.5 碳酸盐缓冲液：

0.1 mol/L 碳酸钠液：称取碳酸钠 10.6 g，加无离子水至 1 000 mL。

0.1 mol/L 碳酸氢钠液：称取碳酸氢钠 8.4 g，加无离子水至 1 000 mL。

C.2.2 量取 0.1 mol/L 碳酸钠液 200 mL，0.1 mol/L 碳酸氢钠液 700 mL，混合即成。

C.3 样品稀释液的配制

加 0.05%吐温-20，1%明胶的 0.02 mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲液。

C.4 酶标抗体稀释液的配制

加 0.05%吐温-20，1%明胶及 5%灭活犊牛血清的 0.02 mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲液。

C.5 底物溶液的配制

pH5.0 磷酸盐柠檬酸缓冲液（内含 0.04%邻苯二胺及 0.045%过氧化氢）。

pH5.0 磷酸盐柠檬酸缓冲液：称取柠檬酸 21.01 g，加无离子水 1 000 mL，量取 243 mL 与 0.2 mol/L 磷酸氢二钠液（见 A.1.1）257 mL 混合，于 4℃冰箱中保存不超过 1 周。

称取 40 mg 邻苯二胺，溶于 1 000 mL pH5.0 磷酸盐柠檬酸缓冲液中（用前从 4℃冰箱中取出，在室温下放置 20 min～30 min）。待溶解后，加入 150 μL 过氧化氢，根据试验需要量可按此比例增减。

C.6 终止液的配制

2 mol/L 硫酸，并取浓硫酸 4 mL 加入 32 mL 无离子水中混匀。

郑州中检生物技术有限公司（仅供下载）
www.nhzjw.com 0371-67896961

附 录 D
（资料性附录）
RT - PCR

D.1 TAE 电泳缓冲液(pH 8.5)的配制

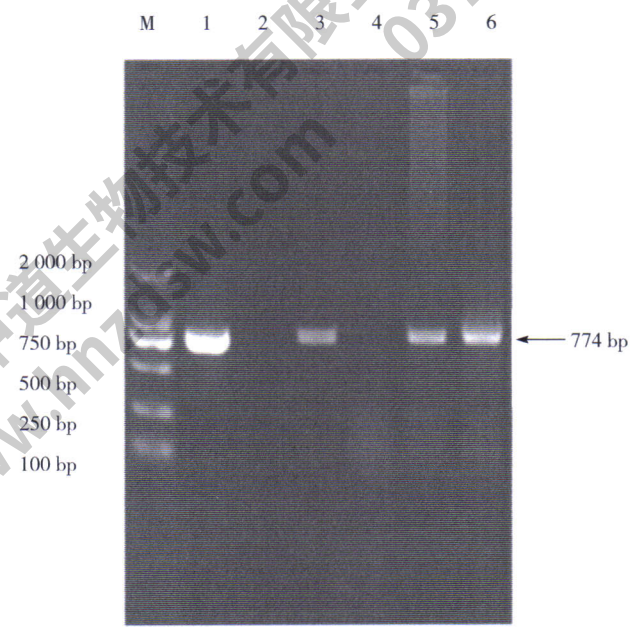
50×TAE 电泳缓冲储存液：

三羟甲基氨基甲烷(Tris 碱)	242 g
乙二胺四乙酸二钠(Na_2EDTA)	37.2 g
双蒸水	800 mL

待上述混合物完全溶解后，加入 57.1 mL 的醋酸充分搅拌溶解，加双蒸水至 1 L 后，置于室温保存。应用前，用双蒸水将 50×TAE 电泳缓冲液 50 倍稀释。

D.2 样品检测结果判定图

见图 D.1。



说明：

M——DL2 000 DNA Marker；
1——阳性对照；
2——阴性对照；
3,5,6——阳性样品；
4——阴性样品。

图 D.1 样品检测结果

郑州中通生物技术有限公司（仅供下载）
www.zhongtongsw.com 0371-67896961