



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1226—2015

代替SN/T 1226—2003

SN/T 1557—2005

禽痘检疫技术规范

Quarantine protocol for fowlpox

2015-02-09 发布

2015-09-01 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国家质量监督检验检疫总局

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准主要依据是 OIE《陆生动物诊断试验和疫苗标准手册》(2012)第 2.3.10 章节《禽痘》。

本标准代替 SN/T 1226—2003《禽痘抗体检测方法 红细胞凝集抑制试验》和 SN/T 1557—2005《禽痘琼脂免疫扩散试验操作规程》。

本标准与 SN/T 1226—2003 和 SN/T 1557—2005 相比,除编辑性修改外,主要技术变化如下:

- 增加了禽痘病毒分离及鉴定;
- 增加了抹片镜检;
- 增加了荧光抗体试验;
- 增加了聚合酶链式反应。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国深圳出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:林庆燕、曾少灵、陶虹、孙洁、秦智锋、唐金明、阮周曦、廖立珊、刘建利、卢体康、陈书琨、陈兵、胡运发。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- SN/T 1226—2003;
- SN/T 1557—2005。

禽痘检疫技术规范

1 范围

本标准规定了禽痘检疫临床诊断、病毒分离与鉴定、抹片镜检、琼脂免疫扩散试验、荧光抗体试验、血凝抑制试验、聚合酶链式反应等的检疫技术要求。

本标准适用于进出境禽痘的检疫、诊断与监测。

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

3 概述

禽痘是由禽痘病毒(avian poxvirus, fowlpox virus)引起禽类的一种急性、高度接触传染病,禽痘病毒属于痘病毒科(poxviridae)禽痘病毒属(avipoxvirus)。禽痘病毒的自然宿主是鸡和火鸡,其他禽类易感性较低,四季都可发生。禽痘的潜伏期一般为4 d~14 d,病程通常为3 w~4 w。根据症状、病变以及病毒侵害禽体部位的不同,分为皮肤型、白喉型、混合型,偶有败血型的发生。

4 诊断技术

4.1 临床综合诊断

禽痘发生的痘疹可出现在皮肤、口腔和咽喉部的黏膜,如冠、肉垂、嘴角、眼皮、耳球和腿、脚、泄殖腔及翅的内侧等,形成特殊的痘疹。痘疹最初为灰白色细小点,随后增大成豌豆大小、灰色或灰黄色的结节,数目较多时可连结成痂块。眼部痘痂可使眼缝完全闭合,口角痘痂则影响家禽采食,可作为初步诊断依据。

4.2 病毒分离与鉴定

4.2.1 设备、材料和试剂

4.2.1.1 设备

超净工作台、台式离心机、冰箱、孵化箱、照蛋器、恒温水浴锅、倒置显微镜、微量可调移液器、恒温恒湿培养箱。

4.2.1.2 材料和试剂

打孔器、酒精灯、电烙铁或针头、胶带、1.0 mL 一次性灭菌注射器、洗耳球(或助吸器)、弯头玻璃吸管、75 cm² 细胞培养瓶、移液管、9 d~12 d 的 SPF 鸡胚、5% 石碳酸、pH 7.2 0.01 mol/L PBS(配制方法

见附录 A)、碘酒或 75% 酒精、MEM 培养基、胎牛血清、抗生素储备液(青霉素 10 000 IU/mL, 链霉素 10 000 μ g/mL, 可直接购买商业抗生素浓缩液)。

4.2.2 样品采集与制备

用剪刀与镊子插入病变组织内, 采集新出现的病变组织 2.0 g 以上, 放入研钵中充分研磨, 加 5 mL pH 7.2 0.01 mol/L PBS 溶液(含青霉素 100 IU/mL, 链霉素 100 μ g/mL)混匀, 将组织悬液转入无菌 10 mL 离心管中, 以 3 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液转入无菌 1.5 mL 离心管中, 编号备用。样品应尽快处理, 可在 4 $^{\circ}$ C 保存 4 d, 如要保存更长时间, 需保存于 -80 $^{\circ}$ C 条件下。

4.2.3 鸡胚分离

4.2.3.1 选择 9 d~12 d 的 SPF 鸡胚, 用 5% 石碳酸进行表面消毒。

4.2.3.2 在照蛋器上观察, 选择鸡胚血管较少的一侧, 用电烙铁在卵壳上烙一个烤焦圈, 或用自制针头(无针尖)沿定位线钻一个直径 5 mm 的圆圈, 但不能钻透壳膜。用刀片挑起一小片卵壳。另外, 在气室上方用针头钻穿一个孔。

4.2.3.3 用一橡皮吸球从气室上的小孔轻吸气, 使胚内形成负压, 使侧面开口处的绒毛尿囊膜下陷。

4.2.3.4 从侧面的开口, 用注射器通过壳膜插入约 5 mm 深, 将 0.1 mL 的样品滴在下陷的绒毛尿囊膜上。缓慢抽出针头, 用胶带将蛋壳上的两个孔全部封住。将气室端向上, 鸡胚于 37 $^{\circ}$ C 孵化箱内孵育(见图 1)。

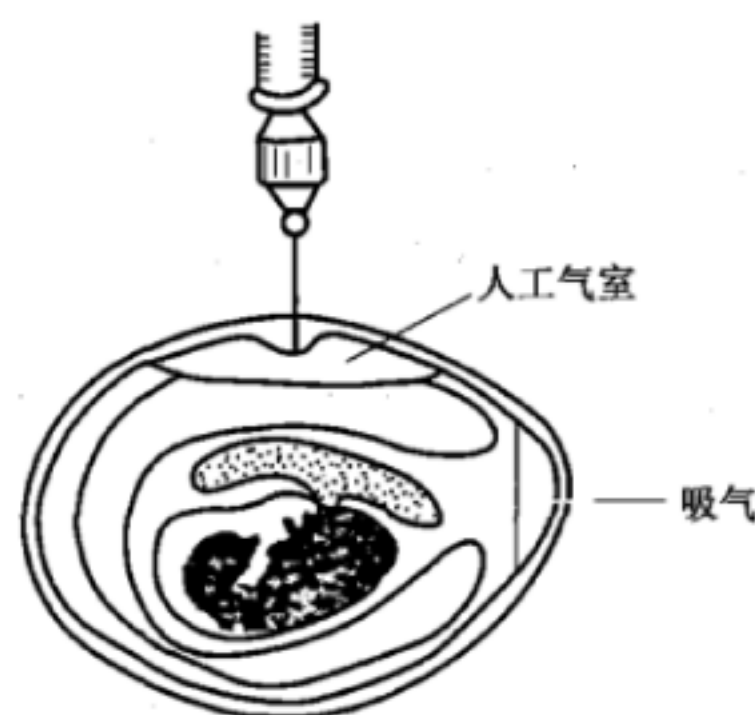


图 1 尿囊膜接种法

4.2.3.5 每日观察接种的鸡胚, 弃掉 24 h 内死亡的鸡胚。

4.2.3.6 第 6 d~7 d 后, 打开蛋壳, 观察鸡胚的绒毛尿囊膜上是否发生水肿增厚, 或者是否产生了呈局灶性或弥漫性分布、致密、坚实的增生性白色痘斑, 记录鸡胚绒毛尿囊膜上的病变情况。

4.2.3.7 绒毛尿囊膜的收取: 将鸡胚放于卵架上, 用碘酒和酒精消毒表面。从气室端剥去卵壳, 用镊子夹住绒毛尿囊膜(或先将鸡胚倾入平皿中, 再用镊子夹住绒毛尿囊膜), 加入几滴 PBS 溶液, 置于暗色平面上, 以便计数痘斑或病斑。按 4.3 进行抹片镜检和结果判定。

4.2.4 细胞分离

4.2.4.1 可以选择原代鸡胚成纤维细胞、鸡胚肾细胞、鸡胚皮肤细胞或鸭胚细胞进行禽痘病毒的繁殖。

4.2.4.2 待细胞长成良好单层后, 吸出原培养液, 每瓶接入按 4.2.2 处理好的样本 0.5 mL。

4.2.4.3 置 37 $^{\circ}$ C 培养箱中吸附 1 h 后, 加入 37 $^{\circ}$ C 预温的新培养液 5 mL, 置 CO₂ 培养箱中继续培养, 逐日观察细胞病变情况(CPE), 拍摄细胞病变影像, 记录结果。

4.2.4.4 结果判定: 禽痘病毒接种鸡胚成纤维细胞, 一般在接种第 4 d~6 d 可产生细胞病变, 如细胞出现变圆、折光性增强等症状, 第 8 d~9 d 细胞发生变形, 完全被破坏。某些病毒株在鸡胚成纤维细胞单

层培养物中能形成具有明显特征的蚀斑,大小约 2 mm~9 mm,中央透明而四周不太透明,类似病毒在鸡胚绒毛尿囊膜上形成痘斑而呈现的环状带。但不是所有的毒株都能在细胞培养层中产生蚀斑,通常适应细胞的毒株才能产生蚀斑。

4.3 抹片镜检

4.3.1 试剂和材料

病禽的皮肤或白喉病变组织,初染剂、0.8%孔雀绿复染剂(配制方法见附录 A)。

4.3.2 操作步骤

4.3.2.1 在载玻片上加 1 滴蒸馏水和少许皮肤或白喉病变组织,用另一载玻片将组织压成薄涂片,并将上层载玻片转动数次。

4.3.2.2 自然干燥后,在火焰上将涂片轻微固定。

4.3.2.3 涂片用新配制的初染剂染色 5 min~10 min。

4.3.2.4 以自来水冲洗玻片。

4.3.2.5 以复染剂复染 30 s~60 s。

4.3.2.6 以自来水冲洗玻片,干燥。

4.3.2.7 油镜下观察涂片。

4.3.2.8 结果判定:如在镜下观察到 0.2 μ m~0.3 μ m 的呈红色的禽痘病毒原生小体,可判定病禽感染了禽痘病毒。

4.4 琼脂免疫扩散试验(AGID)

4.4.1 设备、材料和试剂

平皿(直径为 90 mm)、塑料吸头、打孔器(7 孔梅花样金属打孔器:内孔 4.0 mm,孔间距 3.0 mm),琼脂免疫扩散试验专用的禽痘标准阳性抗原、禽痘标准阳性血清、琼脂糖、氯化钠(NaCl),pH 7.2 的 0.01 mol/L PBS 溶液、1%硫柳汞溶液(配制方法见附录 A)。

4.4.2 操作步骤

4.4.2.1 琼脂板的制备

4.4.2.1.1 称取琼脂糖 1.0 g,加入 pH 7.2 的 0.01 mol/L PBS 溶液至 100 mL。

4.4.2.1.2 加热融化后,加入 8.0 g NaCl,充分溶解后,加入 1.0 mL 1%硫柳汞溶液(终浓度为 0.01%)。

4.4.2.1.3 冷却至 45 $^{\circ}$ C~50 $^{\circ}$ C,将洁净干燥、直径为 90 mm 的灭菌平皿,放置在水平平台上,每个平皿加 18 mL,厚度约为 3.0 mm。

4.4.2.1.4 胶凝固后盖严,把平皿倒置放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。

4.4.2.2 打孔

反应孔现用现打。从冰箱中取出琼脂板,用 7 孔一组的梅花形打孔器进行打孔(见图 2),孔径 4.0 mm,孔距 3.0 mm。将孔中的琼脂糖轻轻挑出或吸出,注意不要破坏孔边缘或使琼脂层脱离玻璃。平皿中各孔排列见图 3。

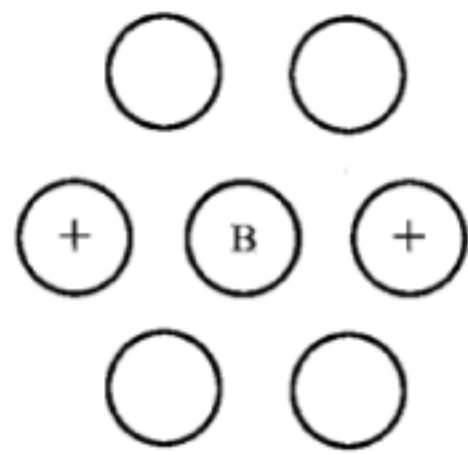


图2 样品少时使用

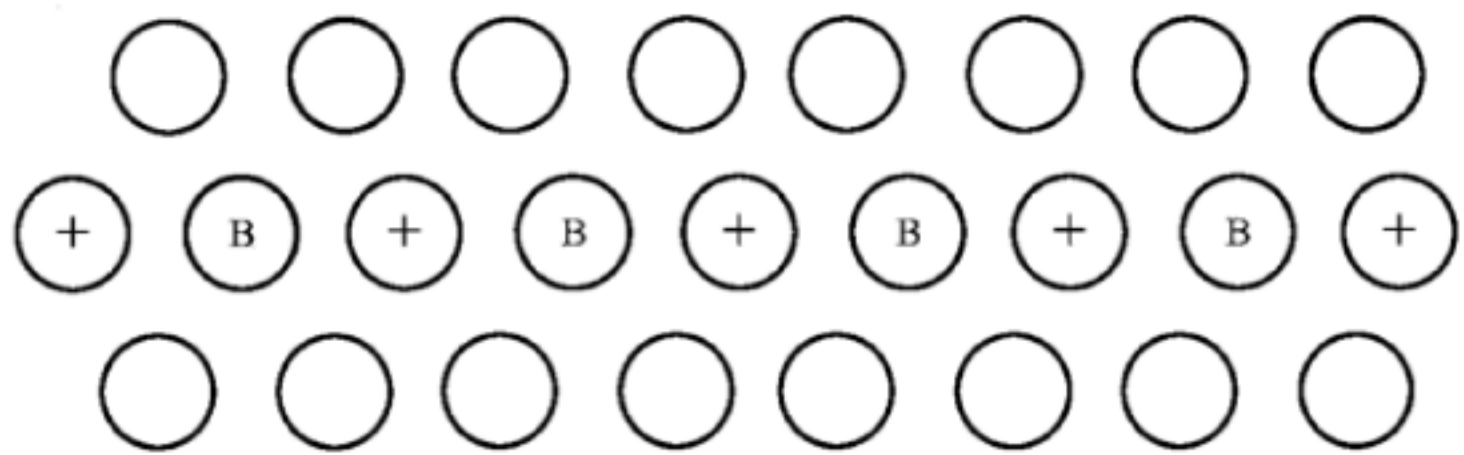


图3 样品多时使用

4.4.2.3 封底

在酒精灯火焰上通过4次~6次加热平皿背面,使底部琼脂稍微融化。

4.4.2.4 加样

结合上列图示,用微量加样器吸取琼脂免疫扩散试验专用的禽痘标准阳性抗原溶液滴入中央B孔,标“+”号的孔加入标准阳性血清,其余孔加入待检血清,每孔均需加满,但不能溢出。不同待检样品需要更换吸头。

4.4.2.5 温育

加样完毕,室温静置10 min,放入保湿盒内置于22℃~26℃下反应,分别在24 h、48 h和72 h观察并记录结果。

4.4.2.6 结果判定

4.4.2.6.1 试验成立的判定

将琼脂板置于日光灯或侧强光下观察,在抗原孔与标准阳性血清孔之间出现一条清晰、致密的沉淀线,说明对照成立,可进行结果判定。

4.4.2.6.2 阳性结果的判定

被检样品与标准阳性血清孔间形成沉淀线,此沉淀线又与标准阳性血清、标准抗原孔间沉淀线相融合;或被检样品与标准阳性血清孔间虽未形成沉淀线,但相邻的标准抗原孔与标准阳性血清孔间的沉淀线末端,在被检样品孔侧向标准阳性血清孔偏弯,且超过标准阳性血清孔与被检样品孔间的中心连线。

4.4.2.6.3 阴性结果的判定

被检样品孔与标准阳性血清孔间不形成沉淀线,且相邻的标准抗原孔与标准阳性血清孔间的沉淀线直伸向该被检样品孔。

4.4.2.6.4 可疑结果的判定

被检样品孔与标准阳性血清孔间不形成沉淀线,相邻的标准抗原孔与标准阳性血清孔间形成的沉淀线。向标准阳性血清孔侧偏弯不超过标准阳性血清孔与被检样品孔间的中心连线,则为疑似反应,对该份样品应复检,仍为疑似则判为阳性。

4.5 荧光抗体试验(FAT)

4.5.1 设备、材料与试剂

4.5.1.1 设备

超净工作台、微量可调移液器、恒温恒湿培养箱、荧光显微镜、倒置显微镜、助吸器、台式离心机、冰箱。

4.5.1.2 材料与试剂

载玻片、酒精灯、弯头玻璃吸管、75 cm² 细胞培养瓶、各种规格无菌移液管(25 mL、10 mL), 抗生素储备液(青霉素 10 000 IU/mL, 链霉素 10 000 μg/mL, 可直接购买商业抗生素浓缩液)、MEM 培养基、胎牛血清等、禽痘标准阳性毒株、异硫氰酸荧光素标记的禽痘抗体; 清洗液: pH 7.4 的 0.01 mol/L PBS 溶液(配制方法见附录 A); 固定液(中性甲醛液): 使用前置 -20 °C 冰箱预冷(配制方法见附录 A)。

4.5.2 操作步骤

4.5.2.1 细胞培养物涂片的制作

按方法 4.2.4 准备已接种待检组织病料的细胞培养物, 进行涂片, 制成待检标本。用接种禽痘标准阳性毒株的细胞培养物制作的细胞培养物涂片作为阳性对照标本。用正常细胞制作的细胞培养物涂片作为阴性对照标本。

4.5.2.2 固定

分别将上述标本在室温下自然风干, 用 -20 °C 预冷的固定液固定 10 min。

4.5.2.3 染色

按抗体使用说明书, 配制异硫氰酸荧光素标记的禽痘抗体, 滴加在细胞标本上, 然后将标本放入湿盒内, 置于 37 °C 恒温培养箱内着染 1 h。

4.5.2.4 漂洗

以 PBS 清洗液浸入洗涤涂片 4 次。

4.5.2.5 镜检

标本上滴加 1 滴缓冲甘油, 在带有适当光栅和滤光片的紫外光显微镜下观察。

4.5.2.6 结果判定

4.5.2.6.1 阴性对照的细胞无荧光产生, 阳性对照出现特异性的粒状胞浆荧光, 则对照成立, 可进行结果判定。

4.5.2.6.2 在细胞浆内出现荧光的, 判定为阳性; 细胞浆内无荧光出现的, 判定为阴性。

4.6 红细胞凝集抑制试验(HI)

4.6.1 设备、材料与试剂

4.6.1.1 设备

微量可调移液器、微量振荡器、离心机。

4.6.1.2 材料与试剂

96孔V型微量反应板、1.5 mL离心管,禽痘标准阳性抗原、禽痘标准阴性血清、禽痘标准阳性血清、0.85% NaCl溶液、pH 7.2 0.01 mol/L PBS溶液、红细胞保存液(阿氏液)、0.5%鸡红细胞悬液(配制方法见附录A)。

4.6.2 操作步骤

4.6.2.1 待检血清的处理

无菌采集待检禽的血液,以3 000 r/min离心5 min分离血清,56℃灭活30 min。

4.6.2.2 血凝试验(HA)

4.6.2.2.1 取干净的96孔V型微量反应板一块,按表1进行操作。

表1 禽痘抗原血凝滴度测定

单位:μL

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
抗原稀释倍数	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1 024	2 048	对照
PBS	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
不同稀释度的抗原	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	0
0.5%红细胞	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
室温(20℃~25℃)30 min												
判定举例	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

4.6.2.2.2 用微量加样器吸取PBS,在板上每孔加入50 μL。

4.6.2.2.3 用微量加样器吸取50 μL禽痘抗原放于第1孔内,充分混匀后,从第1孔中取50 μL移至第2孔,充分混匀后,从第2孔中取50 μL移至第3孔……至第11孔混匀后,取50 μL弃去,第12孔不加抗原作空白对照。

4.6.2.2.4 用微量加样器吸取0.5%红细胞悬液50 μL,依次加入各孔。

4.6.2.2.5 将微量反应板置振荡器振荡2 min,使抗原与红细胞充分混合,室温(20℃~25℃)静置30 min,判定结果,并作好记录。

4.6.2.2.6 以能引起红细胞完全凝集的病毒最高稀释度作为一个红细胞凝集单位。在血凝抑制试验时,使用4个红细胞凝集单位的抗原。表1中1:256为一个红细胞凝集单位,4个单位抗原的稀释倍数为1:64。

4.6.2.3 血凝抑制试验(HI)

4.6.2.3.1 在96孔V型微量反应板上,用微量加样器加样和稀释样品(见表2)。

表2 血清抗体血凝抑制滴度测定

单位: μL

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
血清稀释倍数	2	4	8	16	32	64	128	256	阳性	阴性	抗原	空白对照
PBS	25	25	25	25	25	25	25	25	0	0	25	50
不同稀释度的待检血清	25	25	25	25	25	25	25	25	(25) 阳性血清	(25) 阴性血清	0	0
抗原	(25) PBS	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	0
室温(20℃~25℃)30 min												
0.5%红细胞	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
室温(20℃~25℃)30 min												
判定举例	—	—	—	—	—	—	+	+	—	+	+	—

4.6.2.3.2 每孔加 25 μL pH 7.2 0.01 mol/L PBS。

4.6.2.3.3 第 1 孔加入 25 μL 待检血清,依次倍比稀释至第 8 孔,最后弃去 25 μL 。

4.6.2.3.4 第 9 孔加入 25 μL 阳性血清,作阳性对照孔。

4.6.2.3.5 第 10 孔加入 25 μL 阴性血清,作阴性对照孔。

4.6.2.3.6 第 1 孔不加抗原,只加 25 μL pH 7.2 0.01 mol/L PBS 作待检血清对照;第 11 孔不加待检血清,作抗原对照;第 12 孔不加抗原和血清,作空白对照。

4.6.2.3.7 第 2 孔至第 12 孔分别加入“血凝试验”测定的 4 个红细胞凝集单位(HAU)的抗原 25 μL 。

4.6.2.3.8 将微量反应板置振荡器振荡 2 min,室温(20℃~25℃)静置 30 min。

4.6.2.3.9 每孔各加入 25 μL 0.5%的红细胞悬液,置振荡器中振荡 2 min 后静置 30 min,判定结果。

4.6.2.3.10 每次测定应设定已知滴度的标准阳性血清对照。

4.6.2.4 结果判定

4.6.2.4.1 判定时应首先观察各对照孔是否完全成立。

4.6.2.4.2 红细胞凝集:红细胞分散在孔底,四周均匀的颗粒状凝集且布满整个孔底,判血凝作用为阳性“+”。

4.6.2.4.3 无凝集或凝集抑制:红细胞集中于孔底中央呈圆点状,若将微量反应板倾斜时,圆点能滚动,判血凝作用为阴性“—”或判血凝抑制作用为阳性。

4.6.2.4.4 血凝抑制价:凡能使抗原的血凝作用完全受到抑制的最高血清稀释倍数。

4.6.2.4.5 待检血清的血凝抑制价在 1:8 以上者应判为阳性反应。

4.7 聚合酶链式反应(PCR)——套式 PCR 检测方法

4.7.1 设备、材料与试剂

4.7.1.1 设备

PCR 仪、高速离心机、电泳仪、凝胶成像仪、微量可调移液器。

4.7.1.2 材料与试剂

PCR 反应管、各种量程的吸头,核酸提取试剂、PCR 反应母液、核酸电泳染料(EB 或其他替代物)、核酸电泳上样缓冲液、DNA 分子量标准,核酸电泳缓冲液 TAE、1.2%琼脂糖凝胶(配制方法见附录 A)。

巢式 PCR 引物:外引物序列 P1:5'-CAGCA GGTGC TAAAC AACAA-3';

外引物序列 P2:5'-CGGTA GCTTA ACGCC GAATA-3';

内引物序列 P3:5'-ACGAC CTATG CGTCT TC-3';

内引物序列 P4:5'-ACGCT TGATA TCTGG ATG-3'。

4.7.2 操作步骤

4.7.2.1 第一次 PCR 扩增(外引物 PCR 扩增)

4.7.2.1.1 PCR 反应体系

总体积为 25 μL ,包括 2 \times PCR 缓冲液 12.5 μL 、上下游外引物(浓度均为 10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL 、DNA 聚合酶(1 U/ μL)1 μL 、模板 DNA(100 ng \pm 50 ng DNA)2 μL ,以双蒸水补充体积至 25 μL 。阳性对照以禽痘标准毒株提取的核酸作为 DNA 模板,阴性对照为采用 4.2.4 同样方法制备的不接种病毒的细胞培养物提取的核酸作为模板,空白对照以灭菌双蒸水作为模板。

4.7.2.1.2 PCR 反应条件

94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min \sim 5 min;

94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s \sim 60 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s \sim 60 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s \sim 60 s,35 个循环;

72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

4.7.2.2 第二次 PCR 扩增(内引物 PCR 扩增)

4.7.2.2.1 PCR 反应体系

总体积为 25 μL ,包括 2 \times PCR 缓冲液 12.5 μL 、上下游内引物(浓度均为 10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL 、DNA 聚合酶(1 U/ μL)1 μL 、模板 DNA(第一次 PCR 扩增产物)2 μL ,以双蒸水补充体积至 25 μL 。阳性对照取第一次 PCR 扩增的阳性对照产物 2 μL 作为 DNA 模板。阴性对照采用 4.2.4 同样方法制备的不接种病毒的细胞培养物提取的核酸为模板,空白对照以灭菌双蒸水作为模板。

4.7.2.2.2 PCR 反应条件

94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min \sim 5 min;

94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s \sim 60 s,52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s \sim 60 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s \sim 60 s,35 个循环;

72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

4.7.2.3 PCR 扩增产物的电泳检测

分别取两次 PCR 扩增的产物 10 μL ,在含 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 溴化乙锭(EB)的 1.2%琼脂糖凝胶中进行电泳,以 10 V/cm 恒压电泳,至溴酚蓝指示剂迁移经过凝胶大约 2/3 长度时停止电泳。将凝胶置于凝胶成像仪下观察电泳结果,并作好记录。

4.7.2.4 结果判定

4.7.2.4.1 在第一次 PCR 扩增中,阳性对照出现 587 bp 大小的条带,阴性对照及空白对照没有该条带

出现,则本次实验成立。在实验成立前提下,待检样品中出现大约 587 bp 大小的条带判为阳性,否则判为可疑结果。

4.7.2.4.2 在第二次 PCR 扩增中,阳性对照出现 419 bp 大小的条带,阴性对照及空白对照没有该条带出现,则本次实验成立。在实验成立前提下,待检样品中出现大约 419 bp 大小的条带判为阳性,否则判为阴性。

4.7.2.4.3 在两次 PCR 扩增实验成立前提下,待检样品在外引物 PCR 扩增中,若出现 587 bp 大小的条带,或者在内引物 PCR 扩增中出现 419 bp 大小的条带,或者在两次 PCR 中分别出现了 587 bp 和 419 bp 大小的条带,检测结果均判为阳性。在两次 PCR 扩增中均未出现上述大小条带的,判为阴性。

5 综合判定

禽痘的确诊必须进行实验室检查。当在临床上怀疑有禽痘病毒感染时,可根据实际情况,选用抹片镜检、病毒分离鉴定、琼脂免疫扩散试验、荧光抗体试验和聚合酶链式反应(PCR)等一种或多种方法进行实验室检查,完成确诊。

附 录 A
(规范性附录)
磷酸盐缓冲液配方

A.1 pH 7.2 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲溶液

氯化钠(NaCl)8.0 g,氯化钾(KCl)0.2 g,碳酸氢钠(NaHCO_3)1.15 g,磷酸二氢钾(KH_2PO_4)0.2 g,溶解于双蒸水中,最后定容至 1 000 mL。高压灭菌后保存于 4 ℃备用。

A.2 pH 7.4 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲溶液

磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)2.89 g 及磷酸二氢钾(KH_2PO_4)0.20 g,溶解于双蒸水中,最后定容至 1 000 mL。高压灭菌后保存于 4 ℃备用。

A.3 pH 7.5 0.01 mol/l 磷酸盐缓冲溶液

磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)2.47 g,磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)11.65 g,溶解于双蒸水中,最后定容至 1 000 mL。保存于 4 ℃备用。

A.4 含 1%BSA 的 pH 7.4 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲溶液

磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)2.89 g 及磷酸二氢钾(KH_2PO_4)0.20 g,溶解于双蒸水中,最后定容至 1 000 mL。高压灭菌后保存于 4 ℃备用。取配制好的缓冲液 99 mL,加入 1 mL 胎牛血清(BSA),混匀,保存于 4 ℃,现配现用。

A.5 初染剂

8 mL 碱性复红储存液加 10 mL pH 7.5 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(A.3),再用 Whatman 滤纸过滤,室温储存,待用。

A.6 复染剂(0.8%孔雀绿)

孔雀绿的化学名称是四甲基代二氨基三苯甲烷($\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{ClN}_2$),是翠绿色有光泽的结晶,极易溶于水。称取 0.8 g 孔雀绿,溶解于蒸馏水中,最后定容至 100 mL。常温保存备用。

A.7 5%石碳酸溶液

称取 5 g 苯酚加入 95 mL 蒸馏水,充分溶解即可。4 ℃下可保存半年。

A.8 1%硫柳汞溶液

硫柳汞 1.0 g, 溶解于蒸馏水, 最后稀释至 100 mL, 室温保存备用。

A.9 固定液

中性甲醛液(混合固定液), 甲醛(浓) 120 mL, 加入双蒸水 880 mL, 混匀, 加入磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 4.0 g、磷酸氢二钠(Na_2HPO_4) 13.0 g, 搅拌, 充分溶解。

A.10 0.85%氯化钠溶液(生理盐水)

氯化钠(NaCl) 8.5 g, 溶解于双蒸水中, 最后稀释至 1 000 mL。高压灭菌后保存于 4 °C 备用。

A.11 阿氏(Alsevers)液

氯化钠(NaCl) 4.2 g, 枸橼酸钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) 8.0 g, 枸橼酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) 0.55 g, 葡萄糖($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) 20.5 g, 溶于蒸馏水, 并稀释至 1 000 mL, 用 1 mol/L 的 NaOH 或 1 mol/L 的 HCl 调节 pH 至 6.1, 用孔径为 0.22 μm 的滤膜进行过滤除菌。保存于 4 °C 备用。

A.12 0.5%鸡红细胞悬液

采集至少 3 只 SPF 公鸡静脉血液与等体积阿氏液混合摇匀, 用 pH 7.2, 0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次~5 次, 每次以 3 000 r/min 离心 5 min, 将血浆、白细胞充分洗去、吸出, 至上清液清亮, 再将洗涤后沉淀的红细胞用 pH 7.2 0.01 mol/L PBS 配成体积分数为 0.5% 的红细胞悬液。保存于 4 °C 备用。

A.13 50×TAE 溶液的配制

A.13.1 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠(EDTA)溶液(pH 8.0)配制

二水乙二胺四乙酸二钠($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 18.61 g, 加入灭菌双蒸水 80 mL, 用固体氢氧化钠(NaOH)调 pH 至 8.0, 再以灭菌双蒸水定容至 100 mL。

A.13.2 50×TAE 电泳缓冲液的配制

三羟甲基氨基甲烷(Tris base) 24.2 g, 加冰乙酸 10 mL, 0.5 mol/L EDTA(pH 8.0) 10 mL, 加双蒸水定容至 100 mL, 室温保存备用。使用时用双蒸水稀释为 1×TAE。

A.14 1.2%琼脂糖凝胶的配制

称取 1.2 g 琼脂糖于 100 mL 1×TAE 缓冲液中, 加热融化后充分摇匀, 待冷至 50 °C~60 °C 时, 加入 5 μL 10 mg/mL 的溴化乙锭(EB)贮存液或其他商品化可用于琼脂糖凝胶电泳的 DNA 染料。摇匀, 倒入插好梳子的电泳板上, 凝固后取下梳子, 备用。

中华人民共和国出入境检验检疫

行 业 标 准

禽痘检疫技术规范

SN/T 1226—2015

*

中国标准出版社出版

北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)

北京市西城区三里河北街16号(100045)

总编室:(010)68533533

网址 www.spc.net.cn

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

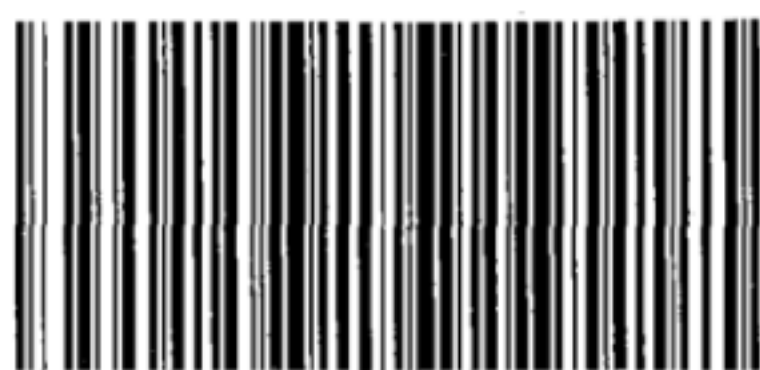
开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 24 千字

2016年3月第一版 2016年3月第一次印刷

印数 1—1 100

*

书号: 155066·2-29853 定价 18.00 元



SN/T 1226-2015