



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4053—2014

鸡传染性贫血检疫技术规范

Quarantine protocol for chicken infectious anemia

2014-11-19 发布

2015-05-01 实施



中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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：中华人民共和国珠海出入境检验检疫局、中华人民共和国东莞出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：沙才华、杨素、陈轩、许彩芸、梁玉英、王岚、陈进会、徐海聂、罗宝正、廖秀云。

鸡传染性贫血检疫技术规范

1 范围

本标准规定了鸡传染性贫血(CIA)病毒分离与鉴定、聚合酶链式反应(PCR)、荧光聚合酶链式反应(荧光 PCR)、间接免疫荧光(IFA)以及酶联免疫吸附试验(ELISA)的技术要求。

本标准适用于鸡传染性贫血的检疫。

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

3 病毒分离与鉴定

3.1 试剂

3.1.1 改良最低要素营养液(DMEM)培养基,配制方法见 A.1。

3.1.2 马立克氏病病毒转化的淋巴细胞系 MDCC-MSB1 细胞。

3.1.3 标准阳性血清:用 CIAV 抗原免疫 SPF 鸡获得的血清。

3.1.4 标准阴性血清:无 CIAV 感染的 SPF 鸡血清。

3.1.5 新生牛血清、青霉素、链霉素。

3.2 仪器与器材

3.2.1 二氧化碳培养箱。

3.2.2 水浴锅。

3.2.3 普通冰箱及低温冰箱。

3.2.4 离心机。

3.2.5 倒置显微镜。

3.2.6 微量移液器,容量 2 μL ~20 μL ,20 μL ~200 μL 。

3.2.7 细胞培养瓶、吸管、离心管、研磨器械、0.2 μm 微孔滤膜。

3.3 样品的采集及处理

CIAV 存在于病鸡肝脏、皮肤、脾脏、胸腺、法氏囊、肾脏和骨髓等组织器官中。无菌采集上述组织,用无血清 DMEM 制成 20%组织悬液,3 000 r/min 离心 30 min,取上清于 70 $^{\circ}\text{C}$ 处理 5 min 后,加等量 10%三氯甲烷室温处理 15 min,10 000 r/min 离心 20 min,取上清用于 CIAV 病毒分离。

3.4 操作方法

3.4.1 细胞培养

用含 15% 新生牛血清的 DMEM 培养基在 39 °C 和 5% 二氧化碳环境下培养 MDCC-MSB1 细胞。每 2 d~3 d 传代一次,待细胞长至 2×10^5 个/mL~ 5×10^5 个/mL 时,用于 CIAV 病毒分离。

3.4.2 病料接种

将 0.1 mL 处理好的组织悬液接种 MDCC-MSB1 细胞,在 39 °C 和 5% 二氧化碳环境下培养 48 h,观察结果。

3.4.3 结果观察

CIAV 感染细胞后,细胞体积增大,随后溶解。若第一次接种未出现细胞病变,将细胞培养物冻融后盲传三代。如仍无细胞病变,则判为 CIAV 阴性。

3.5 CIAV 的鉴定

出现细胞病变的细胞培养物,用 PCR 和荧光 PCR 方法进行鉴定。

4 聚合酶链式反应(PCR)¹⁾

4.1 试剂

4.1.1 除特别说明以外,本标准所用水应符合 GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法的要求,所用试剂均为分析纯。

4.1.2 DNA 提取液(配制方法参见附录 B)。

4.1.3 三氯甲烷(常温保存)。

4.1.4 异丙醇(使用前预冷至 -20 °C)。

4.1.5 75% 乙醇,采用无水乙醇和灭菌双蒸水配制,使用前预冷至 -20 °C。

4.1.6 0.01 mol/L PBS, pH 7.2(配方见 A.2)。

4.1.7 TE 缓冲液(配制方法见 A.3)。

4.1.8 电泳缓冲液(配制方法见 A.4)。

4.1.9 溴化乙锭溶液(10 mg/mL)。

4.1.10 CIAV CUX-1 标准株 DNA, 10×PCR 缓冲液, 25 mmol/L 的 $MgCl_2$, 10 mmol/L 的 dNTPs, 5 U/ μ L 的 Taq DNA 聚合酶。

4.1.11 选择 CIAV 特异性 VP1 基因序列作为 CIAV 检测的靶序列,产物长度 582 bp,上游引物和下游引物序列如下:

上游引物: 5'-AATGAACGCTCTCCAAGAAG-3'

下游引物: 5'-AGCGGATAGTCATAGTAGAT-3'

4.2 仪器与器材

4.2.1 PCR 仪。

4.2.2 紫外成像仪。

1) 同类的商品化试剂盒适用。

4.2.3 电泳仪。

4.2.4 高速台式冷冻离心机(可控温至 4℃、离心速度可达 12 000 r/min 以上)。

4.2.5 水浴锅。

4.2.6 生物安全柜。

4.2.7 微量移液器,0.1 μL~2.5 μL,1 μL~10 μL,10 μL~100 μL,20 μL~200 μL,100 μL~1 000 μL,并配备与移液器匹配的无 DNA 酶和 RNA 酶的吸头。

4.2.8 1.5 mL 无 DNA 酶的离心管、0.2 mL 无 DNA 酶的 PCR 薄壁管、八联管或 96 孔板。

4.3 样品的采集和处理

4.3.1 取待检鸡的胸腺、骨髓等组织 25 mg,加入 4 倍体积的 TE,匀浆化;取感染 CUX-1 标准株的 MSB1 细胞的 DNA 为阳性对照,1 日龄 SPF 鸡胸腺匀浆物 DNA 为阴性对照。

4.3.2 将匀浆化的组织反复冻融 3 次,2 000 r/min 离心 10 min,取上清液。

4.4 样品 DNA 的提取

4.4.1 取 n 个灭菌的 1.5 mL 离心管(n 为被检样品与阴性、阳性对照之和)。

4.4.2 每管加入 250 μL DNA 提取液(配制方法参见附录 B),然后分别加入被检样本、阴性对照和阳性对照各 250 μL,一份样本换用一个吸头,再加入 10 μL 蛋白酶 K(1 mg/mL),振荡混匀,56℃消化 2 h,加入等体积的酚:三氯甲烷:异戊醇(25:24:1),混匀,12 000 r/min 离心 15 min。

4.4.3 取与 4.4.1 相同数量灭菌的 1.5 mL 离心管,吸取 4.4.2 各管中的上清液转移至相应的管中,尽量避免吸出中间层,然后再分别加入 2 倍体积的-20℃预冷的无水乙醇,颠倒混匀。

4.4.4 12 000 r/min 离心 15 min,小心倒去上清液,倒置于吸水纸上,沾干液体;加入 800 μL 75%乙醇,颠倒洗涤。

4.4.5 12 000 r/min 离心 10 min,小心倒去上清液,倒置于吸水纸上,尽量沾干液体。

4.4.6 4 000 r/min 离心 10 s,将管壁上的残余液体甩到管底部,小心倒去上清液,用微量加样器将其吸干,室温干燥 5 min~10 min。

4.4.7 加入 10 μL 灭菌双蒸水,溶解管壁上的 DNA,5 000 r/min 离心 5 s,4℃保存备用。若需长期保存应放置-70℃冰箱。

4.5 PCR 扩增检测

4.5.1 将下列试剂按要求量加入到 PCR 管中:灭菌三蒸水 36 μL;10 倍浓度的 PCR 扩增缓冲液 5 μL;25 mmol/L 的 MgCl₂ 3 μL;10 mmol/L 的 dNTPs 2 μL;25 mmol/L 的引物 1 和引物 2 各 1 μL;Taq DNA 聚合酶 1 μL;样品 DNA 溶液 1 μL。

4.5.2 感染 CUX-1 标准株的 MSB1 细胞的 DNA 为阳性对照,SPF 鸡组织匀浆物 DNA 为阴性对照。

4.5.3 将加有样品和对照 DNA 的 PCR 管放入 PCR 仪中,按下述程序和条件进行 PCR 扩增:95℃5 min;93℃1 min,50℃1 min,72℃1 min,30 次循环;72℃延伸 10 min,反应结束后将 PCR 产物置于 4℃或-20℃保存。

4.5.4 制备 1%琼脂糖凝胶板(含溴化乙锭,配制方法见 A.5),将样品及阴阳性对照的 PCR 产物 9 μL 与 1 μL PCR 上样缓冲液混合后,按编号加入到对应的凝胶孔中,凝胶板的边孔中加入标准分子量(DNA Marker)。

4.5.5 凝胶在 80 V 恒定电压下电泳 1 h,用紫外凝胶成像管理系统内观察结果、照像。

4.5.6 对出现目的条带的 PCR 扩增产物进行测序,并与参考序列进行比对。

4.6 结果及判定

4.6.1 当阳性对照出现 582 bp 目的条带(序列见附录 C),阴性对照和空白对照均未出现目的条带时,

SN/T 4053—2014

试验成立。

4.6.2 当被检样品出现 582 bp 目的条带时,且测序结果与附录 C 的参考序列符合程度在 95%以上判为阳性。

4.6.3 当被检样品未出现 582 bp 目的条带,或测序结果与附录 C 的参考序列符合程度在 95%以下均判为阴性。

5 荧光聚合酶链式反应(荧光 PCR)²⁾

5.1 试剂

5.1.1 鸡传染性贫血病毒荧光 PCR 检测试剂盒,—20℃保存,组成及使用注意事项参见附录 B。

5.1.2 引物和探针序列:

本标准选择 CIAV 特异性 VP1 基因序列作为 CIAV 检测的靶序列,产物长度 91 bp。

上游引物:5'GCCGATTTTACGCCTTCA 3'

下游引物:5'TACCGCTGTCTCCTCCG 3'

Taq Man 探针:5'CACCTCAAGCGACTTCGACGAA 3',其 5'端和 3'端分别标记 FAM 和 BHQ (或 Tamra 或 Eclipse)。

5.1.3 其他试剂见 4.1.1~4.1.6。

5.2 仪器与器材

5.2.1 荧光 PCR 仪。

5.2.2 其他仪器与器材见 4.2.4~4.2.8。

5.3 样品的采集和处理

按 4.3 进行。

5.4 样品 DNA 的提取

按 4.4 进行。

5.5 荧光 PCR

5.5.1 扩增试剂配制

在反应混合物配制区进行。

取出 CIAV 荧光 PCR 反应液(配制方法参见附录 B),在室温下融化后,6 000 r/min 离心 5 s,每个荧光 RT-PCRPCR 反应按表 1 用量配制 PCR 反应混合液(需配制反应液数量=样本个数+阴性对照+阳性对照+1)。

表 1 荧光 PCR 反应混合液配制表

试剂	CIAV PCR 反应液	Taq 酶(5 U/μL)
用量	21.75 μL	0.25 μL

将以上 PCR 反应试剂按使用量吸取到一个离心管中,充分混匀,然后在每个 PCR 管中分装 22 μL,

2) 同类的商品化试剂盒适用。

转移至样本处理区。

5.5.2 加样

在已分装有 PCR 反应混合液的 PCR 管中分别加入已提取好的核酸 3 μL , 盖上管盖, 将 PCR 管放入荧光 PCR 检测仪内, 记录样本放置顺序。

5.5.3 荧光 PCR 反应

在扩增检测区进行。反应条件设定:

- a) 50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;
 - b) 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 40 个循环。
- 60 $^{\circ}\text{C}$ 时设置采集荧光。

5.5.4 荧光素设定

报告基团(Report Dye)设定为 FAM, 淬灭基团(Quench Dye)设定为 BHQ(或 Tamra 或 Eclipse), Reference dye 设定为 None。

5.6 分析条件设定及结果判定

5.6.1 质控标准

CIAV 阳性对照和阴性对照质控标准: 阳性对照有 S 型 PCR 扩增曲线, 而且每个反应管内的荧光信号量达到设定的阈值时所经历的循环数(C_t 值)小于或等于 30; 阴性对照无 S 型 PCR 扩增曲线, 且 C_t 值为无。否则此次实验结果无效。

5.6.2 结果判定及描述

有 S 型 PCR 扩增曲线, 且 C_t 值 ≤ 30 的样本, 判为 CIAV 核酸阳性; $30 < C_t$ 值 < 40 的样本, 判为 CIAV 核酸可疑, 需进行复检, 复检后, 若 C_t 值 < 40 , 判为 CIAV 核酸阳性, 否则判为阴性; 无 S 型 PCR 扩增曲线, 且 C_t 值为无的样本, 判为 CIAV 核酸阴性。

5.7 注意事项

实验室注意事项见附录 D。

6 间接免疫荧光试验(IFA)

6.1 试剂

- 6.1.1 CIAV CUX-1 标准株。
- 6.1.2 MDCC-MSB1 细胞。
- 6.1.3 丙酮。
- 6.1.4 乙醇。
- 6.1.5 0.01 mol/L PBS, pH 7.2, (配方见 A.2)。
- 6.1.6 兔抗鸡 IgG 荧光抗体。

6.2 仪器和器材

- 6.2.1 荧光显微镜。

SN/T 4053—2014

6.2.2 生物培养箱。

6.2.3 台式离心机。

6.2.4 96 孔细胞培养板。

6.3 样品的处理

取待检鸡的血清,将血清以 1:10~1:40 稀释,标准阳性及阴性血清做同样稀释。

6.4 抗原的制备

用 96 孔细胞培养板培养 MSB1 细胞,在对数生长时接种 CUX-1 标准毒株感染 MSB1 细胞,感染 72 h 后,1 000 r/min 离心 10 min,弃去上清,用-20℃预冷的固定液(40%体积的乙醇,60%体积的丙酮)固定 5 min~10 min,弃去固定液,干燥后可置于-20℃长时间保存;未感染病毒的 MSB1 细胞同法处理作为对照。

6.5 IFA 检测步骤

6.5.1 分别将稀释过的阳性血清、阴性血清以及待检血清样本滴于固定的 96 孔细胞培养抗原上,每孔 100 μ L。

6.5.2 于 37℃培养箱反应 30 min。

6.5.3 用 PBS 洗 3 次,每次 5 min。

6.5.4 滴加工作浓度的荧光二抗(FITC 标记的兔抗鸡 IgG 抗体,可根据各公司商品标注的工作浓度稀释)。

6.5.5 重复 6.5.2。

6.5.6 重复 6.5.3。

6.5.7 滴加一滴 PBS 甘油,置于倒置荧光显微镜下观察。

6.6 检测结果的判定

6.6.1 当阳性对照细胞内出现特异性亮绿色荧光,阴性对照细胞内未见特异荧光时,试验成立。阴性对照出现荧光,为非特异荧光,试验不成立,应重新试验。

6.6.2 当待检孔细胞出现与阳性对照相同的亮绿色荧光,判为抗体阳性。当待检孔细胞未见特异性荧光时,判为抗体阴性。

7 酶联免疫吸附试验(ELISA)³⁾

7.1 试剂

7.1.1 酶标羊抗鸡 IgG。

7.1.2 包被液、洗涤液、底物液及样品稀释液(配制方法分别见 A.6,A.7,A.8,A.9)。

7.2 仪器和器材

7.2.1 酶标检测仪。

7.2.2 培养箱。

7.2.3 96 孔可拆卸式 ELISA 微量滴定板。

7.2.4 微量移液器,容量 2 μ L~20 μ L,20 μ L~200 μ L。

3) 同类的商品化试剂盒适用。

7.3 样品的处理

将待检血清用样品稀释液稀释 20 倍,阳性及阴性血清进行同样浓度稀释。

7.4 试验操作步骤

7.4.1 用基因工程方法体外表达的 CIAV VP1 蛋白,经纯化后,作为抗原包被 ELISA 酶标板。

7.4.2 取 ELISA 微量滴定板,以包被液稀释抗原,每孔加入 100 μL ,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。

7.4.3 倒掉液体,用洗涤液洗板 3 次,每次 5 min。

7.4.4 每孔加入样品稀释液 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h。

7.4.5 重复 7.4.3。

7.4.6 每孔加入稀释过的样品 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h,同时设已知空白、已知阳性及阴性样本各两孔,每孔 100 μL 作对照。

7.4.7 重复 7.4.3。

7.4.8 每孔加入稀释至工作浓度(根据各公司商品标注的浓度稀释)的酶标羊抗鸡 IgG 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h。

7.4.9 重复 7.4.3。

7.4.10 加入底物液 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 20 min。

7.4.11 加入终止液(2 mol/L H_2SO_4),每孔 50 μL 。

7.4.12 酶标仪在 492 nm 读值。

7.5 检测结果的判定

7.5.1 质控标准

阴性样本的 OD 值在 0.2 以下,空白对照的 OD 值小于 0.1,阳性对照的 OD 值在 0.5 或以上时,试验成立。否则,实验应视为无效。

7.5.2 结果描述及判定

样本的 OD 值大于或等于 0.5 时,判为阳性;否则样品为阴性。当使用不同商品化试剂盒时,应根据所使用的试剂盒说明书的判定方法和标准进行判定。

附录 A

(规范性附录)

试剂配制

A.1 DMEM(改良)培养液

A.1.1 量取去离子水 950 mL,置于适宜的容器中。

A.1.2 将 DMEM 粉剂 10 g 加于 30 ℃ 的去离子水中,边加边搅拌。

A.1.3 每 1 000 mL 培养液加 3.7 g 碳酸氢钠。

A.1.4 加去离子水至 1 000 mL,用 1 mol/L 氢氧化钠或盐酸将培养液 pH 值调至 pH 6.9~7.0。在过滤之前应盖紧容器瓶塞。

A.1.5 立即用孔径 0.2 μm 的微孔滤膜正压过滤除菌,4 ℃ 冰箱保存备用。

A.2 磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L PBS,pH 7.2)

先配制 A 液、B 液:

A 液(0.2M NaH_2PO_4 溶液):

称取一水合磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)27.6 g,或二水合磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)31.2 g,溶于蒸馏水中,定容至 1 000 mL。

B 液(0.2M Na_2HPO_4 溶液):

称取十二水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)71.6 g,或二水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)35.6 g,溶于蒸馏水中,定容至 1 000 mL。

称取 8.5 g 氯化钠,用适量蒸馏水溶解,量取 14 mL A 液加 B 液 36 mL,用蒸馏水定容至 1 L,121 ℃ 高压灭菌 20 min 后待用。

A.3 TE 缓冲液的制备(pH 8.0)

Tris HCl	10 mmol/L
EDTA	1 mmol/L

A.4 TAE 缓冲液(50 倍)

三羟甲基氨基甲烷碱(Tris base)	242 g
冰乙酸	57.1 mL
乙二胺四乙酸(EDTA)(0.5 mol/L pH 8.0)	100 mL
蒸馏水	700 mL

待上述混合物完全溶解后,加蒸馏水至 1 000 mL,至 4 ℃ 冰箱中备用,如配制 1% 的琼脂糖凝胶和用作电泳缓冲液,则用蒸馏水稀释 50 倍成 TAE 缓冲液。

A.5 1%琼脂糖凝胶板制备

取 0.5 g 琼脂糖加入 50 mL TAE 缓冲液中,在微波炉中充分溶解后,用 TAE 定容至 50 mL,冷却

至 60 °C 后,加入 3 μ L 的溴化乙锭,倒入凝胶板中,插入梳子,待凝胶完全凝固后拔去梳子,备用。

A.6 包被液:碳酸盐缓冲液

碳酸钠	1.59 g
碳酸氢钠	2.93 g
加蒸馏水至	1 000 mL
调 pH 至	9.6

A.7 洗涤液(PBST)pH 7.4

即 PBS+吐温-20

NaCl	8 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2.9 g
KCl	0.2 g
吐温-20	0.5 mL
加水至	1 000 mL

A.8 样品稀释液

于 PBST 中加入 BSA 至终浓度为 0.1%。

A.9 底物液

2%无水柠檬酸液	24.3 mL
磷酸氢二钠液(0.2 mol/L)	25.7 mL
邻苯二氨(OPD)	40 mg
30% H ₂ O ₂	0.15 mL
加蒸馏水至	100 mL

附录 B

(资料性附录)

荧光 PCR 试剂盒的组成及使用说明

B.1 试剂盒组成

每个试剂盒可做 48 个检测,包括以下成分:

CIAV PCR 反应液	1.1 mL×1 管
<i>Taq</i> 酶	12.5 μ L×1 管
阴性对照	1.0 mL×1 管
阳性对照	1.0 mL×1 管
双蒸水	1.0 mL×1 管
DNA 提取液	12.5 mL×1 管

B.2 说明

B.2.1 CIAV PCR 反应液(下列试剂为终浓度):含 50 mmol/L KCl,10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.3), 2.5 mmol/L $MgCl_2$,0.2 mmol/L dNTP mix(脱氧核苷三磷酸),上、下游引物各 20 nmol/mL,探针 10 nmol/mL,1U *Taq* 酶,5%甘油。

B.2.2 阳性对照:CIAV 靶基因 DNA。

B.2.3 DNA 提取液主要成分:20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.4),200 mmol/L EDTA,1% SDS。

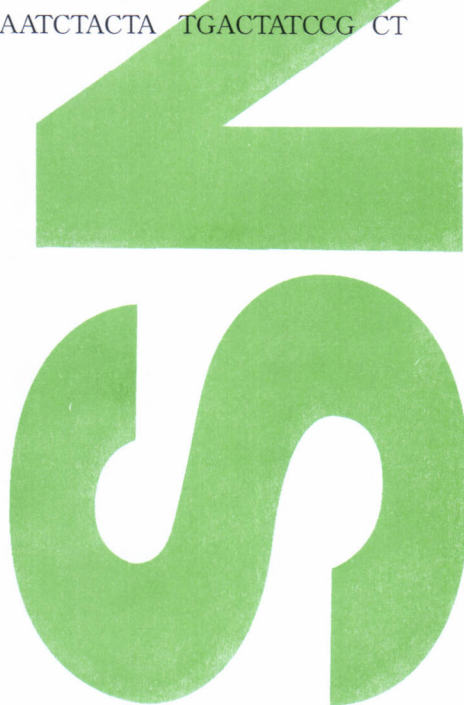
B.3 使用时的注意事项

B.3.1 在检测过程中,应严防不同样品间的交叉污染。

B.3.2 反应液分装时应避免产生气泡,上机前检查各反应管是否盖紧,以免荧光物质泄露污染仪器。

附 录 C
(规范性附录)
PCR 产物测序结果

AATGAACGCT CTCCAAGAAG ATACTCCACC CGGACCATCA ACGGCGTTCA GGCCACCAAC
AAGTTCACGG CCGTTGGAAA CCCCTCACTG CAGAGAGATC CGGATTGGTA TCGCTGGAAT
TACAATCACT CTATCGCTGT GTGGCTGCGC GAATGCTCGC GCTCCACGC TAAGATCTGC
AACTGCGGAC AATTCAGAAA GCACTGGTTT CAAGAATGTG CCGGACTTGA GGACCGATCA
ACCCAAGCCT CCCTCGAAGA AGCGATCCTG CGACCCCTCC GAGTACAGGG TAAGCGAGCT
AAAAGAAAGC TTGATTACCA CTACTCCCAG CCGACCCCGA ACCGCAAGAA GGTGTATAAG
ACTGTAAGAT GGCAAGACGA GCTCGCAGAC CGAGAGGCCG ATTTTACGCC TTCAGAAGAG
GACGGTGGCA CCACCTCAAG CGACTTCGAC GAAGATATAA ATTTGACAT CGGAGGAGAC
AGCGGTATCG TAGACGAGCT TTAGGAAGG CCTTTCACAA CCCCCGCCCC GGTACGTATA
GTGTGAGGCT GCCGAACCCC CAATCTACTA TGACTATCCG CT



附 录 D
(规范性附录)

鸡传染性贫血病毒 PCR、荧光 PCR 检测方法的实验室规范

D.1 实验室设置要求

D.1.1 实验室应为生物安全Ⅱ级(BSL-2级)及以上实验室。

D.1.2 实验室分区:PCR 试验区域分 PCR 反序液配制区-配液区、模板提取区、扩增区、电泳区;流程顺序为配液区→模板提取区→扩增区→电泳区。并且明确标识,严禁器材和试剂倒流。

D.1.3 在不同的工作区域应使用不同颜色或有明显区别标志的工作服,工作服不能穿离各特定区域。

D.1.4 实验室清洁时应按 PCR 反应混合物配制区、样本制备区至检测区的顺序进行。

D.1.5 不同的实验区域应有其各自的清洁用具以防止交叉污染。

D.2 工作区域仪器设备配置

D.2.1 样本制备区仪器设备配置

2℃~8℃冰箱;-20℃冰箱;冰冻台式离心机($\geq 12\,000$ r/min);混匀器;微量加样器(0.5 μL~10 μL,5 μL~20 μL,20 μL~200 μL,200 μL~1 000 μL);可移动紫外灯。

D.2.2 PCR 反应混合物配制区

2℃~8℃冰箱;-20℃冰箱;台式离心机($\geq 3\,000$ r/min);混匀器;微量加样器(0.5 μL~10 μL,5 μL~20 μL,20 μL~200 μL,200 μL~1 000 μL);可移动紫外灯。

D.2.3 检测区仪器设备配置

荧光 PCR 仪、可移动紫外灯、打印机。

D.3 各工作区域功能及注意事项

D.3.1 样本制备区

D.3.1.1 标本的保存,核酸提取、贮存及其加入至扩增反应管在样本制备区进行。

D.3.1.2 可在本区内设立正压条件以避免邻近区的气溶胶进入本区造成污染。

D.3.1.3 用过的加样器吸头应放入专门的消毒(例如含次氯酸钠溶液)容器内。实验室桌椅表面每次工作后都要清洁,实验材料(原始样本、提取过程中样本与试剂的混合液等)如出现外溅,应作清洁处理并作出记录。

D.3.1.4 对实验台适当的紫外照射(254 nm 波长,与工作台面近距离)可以帮助灭活病毒和消除核酸的污染。工作后通过移动紫外线灯管来确保对实验台面的充分照射。

D.3.2 PCR 反应混合物配制区

D.3.2.1 试剂的分装和反应混合液的制备在本区进行。

D.3.2.2 在整个本区的实验操作过程中,操作者应戴手套。工作结束后应立即对工作区进行清洁。本

工作区的实验台表面应可耐受诸如次氯酸钠等的化学物质的消毒清洁作用。

D.3.3 检测区

D.3.3.1 在本区进行荧光 PCR 检测。

D.3.3.2 PCR 扩增产物不能在本实验室开盖,PCR 管应抛弃在远离本实验室的垃圾箱中。实验完成后采用紫外灯对实验室进行充分照射。
