



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1173—2015
代替 SN/T 1173—2003

鸡病毒性关节炎检疫技术规范

Quarantine protocol for avian viral arthritis

2015-12-04 发布

2016-07-01 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国家质量监督检验检疫总局

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
鸡病毒性关节炎检疫技术规范
SN/T 1173—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 26 千字
2016年7月第一版 2016年7月第一次印刷
印数 1—1 100

*

书号: 155066·2-30288 定价 18.00 元

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 SN/T 1173—2003《鸡病毒性关节炎抗体检测方法 酶联免疫吸附试验》。本标准与 SN/T 1173—2003 相比,主要技术变化如下:

- 增加了临床诊断方法;
- 增加了病原分离鉴定方法;
- 增加了荧光抗体法检测病原;
- 增加了鸡病毒性关节炎病毒核酸检测方法;
- 增加了琼脂扩散试验检测鸡血清中抗鸡病毒性关节炎抗体的方法;
- 修改了酶联免疫吸附试验。

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、深圳市检验检疫科学研究院、华南农业大学。

本标准主要起草人:曹琛福、陈兵、林庆燕、卢体康、杨俊兴、秦智锋、贾伟新、花群义、吕建强、叶奕优、曾少灵。

鸡病毒性关节炎检疫技术规范

1 范围

本标准规定了鸡及其产品中鸡病毒性关节炎病毒的分离与鉴定、免疫荧光抗体检测反应、实时荧光 RT-PCR 试验、琼脂凝胶免疫扩散试验和酶联免疫吸附试验检疫方法的技术规范。
本标准适用于鸡病毒性关节炎病原学和血清学的检验检疫。

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 术语、定义和缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

鸡病毒性关节炎 avian viral arthritis;AVA

一种由禽呼肠孤病毒(*Avian reoviridae*)引起的鸡的重要传染病。病毒主要侵害关节滑膜、腱鞘和心肌,引起足部关节肿胀,腱鞘发炎,继而使腓肠腱断裂。病鸡关节肿胀、发炎,行动不便,跛行或不愿走动,采食困难,生长停滞。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

- DEPC:焦碳酸二乙酯(diethypyrocarbonate)
- dNTP:脱氧核糖核苷三磷酸(deoxy-ribonucleoside triphosphate)
- ELISA:酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay)
- IFA:间接免疫荧光试验(indirect immunofluorescence assay)
- PBS:磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline)
- RT-PCR:反转录聚合酶链式反应(reverse transcription PCR)
- SPF:无特定病原体(specific pathogen free)

4 临床诊断

4.1 流行病学

禽呼肠孤病毒主要引起肉鸡发病,偶见蛋鸡和火鸡,可水平传播和垂直传播。鸡病毒性关节炎的感染率和发病率随鸡的年龄越大,敏感性越低,10 周龄之后明显降低。

SN/T 1173—2015

4.2 临床症状

呼肠孤病毒感染的临床症状和流行方式表现多样化和复杂性。

I 型(吸收障碍型)潜伏期在自然感染中较难确定。病鸡以体弱,精神不振,羽毛生长不良和腿弱及跛行为特征。1 周~3 周龄雏鸡吸收障碍的症状包括色素沉着不良、羽毛异常、生长不均、骨质疏松、腹泻、粪便中有未消化的饲料,死亡率增加等。发病率为 5%~20%,病死率一般为 12%~15%。

II 型(关节炎/腱鞘炎型)多发于 4 周~7 周龄肉鸡,主要症状为跗关节上方胫骨和腱束双侧肿大,腱移动受限,表现不同程度的跛行继而出现腓肠肌腱断裂。1 d~7 d 雏鸡可见肝炎、心肌炎。病鸡可能在 1 周~3 周内由急性期恢复,但也可能变为慢性。病程稍长时,患肢多向外扭转,步态蹒跚。同时病鸡发育不良,且长期不能恢复。发病率高达 100%,但死亡率不及 6%。

III 型表现吸收障碍和/或关节炎(腱鞘炎)的临床症状。

4.3 病理剖检变化

患鸡跗关节周围肿胀,切开皮肤可见关节上部腓肠腱水肿,滑膜内常有充血或点状出血,关节腔内含有淡黄色或血样渗出物。根据病程的长短,有时可见周围组织与骨膜脱离。成年鸡容易发生腓肠腱断裂。慢性病例的关节腔内渗出物较少,腱鞘硬化和粘连,在跗关节远端关节软骨上出现凹陷的点状溃烂,然后变大、融合,延伸到下方的骨质,关节表面纤维软骨膜过度增生。有的切面可见肌和腱交接部发生不全断裂和周围组织粘连,关节腔有脓样、干酪样渗出物。

4.4 病原学及组织学病理变化

参见附录 A。

5 病料采集与处理

5.1 试剂与仪器

青霉素、链霉素、磷酸盐缓冲液。

无菌离心管、剪刀、镊子、研钵、高速台式冷冻离心机、涡旋振荡器、冰箱、微量可调移液器等。

5.2 全血或血清

取疑似病鸡的全血,也可分离血清(将全血室温静置 30 min,3 000 r/min 离心 5 min,收集上清液,即为血清)。样品应无溶血,无细菌污染。以冷藏状态立即送实验室检疫,不能立即送检的应于 4 ℃ 保存。

5.3 组织或脏器

采集疑似病鸡富含病毒的肝、脾、肿胀的腱鞘、气管和支气管等分别于研钵中充分研磨,再加 1 倍~2 倍磷酸盐缓冲液(含青霉素 200 IU/mL,链霉素 200 IU/mL)混匀,然后将组织悬液转入无菌 1.5 mL 离心管中 5 000 r/min 离心 5 min,取上清液转入另一无菌 1.5 mL 离心管中,编号,—80 ℃ 保存备用。若需采取组织免疫荧光抗体法检测脏器或组织,则直接采集疑似病鸡肝、脾、肿胀的腱鞘等以冷藏状态立即送实验室检疫,不能立即送检的应于—80 ℃ 保存。

5.4 关节腔内渗出物

无菌条件下用剪刀剪开关节腔,用无菌棉拭子沾取关节腔内的渗出物,把棉拭子头放入盛有 1.5 mL 磷酸盐缓冲液(含青霉素 200 IU/mL,链霉素 200 IU/mL)中搅匀,盖上管盖并编号,以冷藏状

态立即送实验室检疫,不能立即送检的应 5 000 r/min 离心 5 min 后取上清液-80 ℃保存。

5.5 泄殖腔棉拭子

将棉拭子深入泄殖腔转一圈沾取泄殖腔分泌物,把棉拭子头放入盛有 1.5 mL 磷酸盐缓冲液的无菌离心管中(含青霉素 200 IU/mL,链霉素 200 IU/mL)混匀,盖上管盖并编号,以冷藏状态立即送实验室检疫,不能立即送检的应 5 000 r/min 离心 5 min 后取上清液-80 ℃保存备用。

6 病原的分离培养与鉴定

6.1 试剂与材料

5%碘酊、70%乙醇、SPF 鸡胚、原种鸡胚肾细胞、DMEM 液体培养基、石蜡、阳性血清、阴性血清、50%甘油 PBS 等。

试验用水应符合 GB/T 6682 要求。

6.2 仪器与设备

照蛋器、铅笔、开孔器、注射器、6 号针头、剪刀、镊子、冰箱、细胞培养瓶、孵化箱、CO₂ 培养箱等。

6.3 样品的采集

样品的采集见 5.2~5.4。

6.4 病毒分离培养与鉴定——鸡胚接种

6.4.1 鸡胚接种

将 5 日~7 日龄 SPF 鸡胚用照蛋器照视检查,并用铅笔标记气室和胚胎位置,垂直放置在蛋架上,钝端朝上。用 5%碘酊消毒蛋壳气室后,用 70%乙醇脱碘消毒。用开孔器在气室中央的蛋壳上钻一小孔,用带有 6 号针头的 1 mL 注射器将处理好的样品从小孔处沿胚的纵轴迅速刺入约 3 cm,注入 0.2 mL~0.5 mL 待接种的病毒于卵黄囊内,接种后用熔化石蜡封孔,于 35 ℃~37 ℃孵化箱内孵育,接种后 3 d~5 d 收取死亡鸡胚,可见胚体出血,内脏器官充血或出血。存活胚发育不良,肝、脾、心脏肿大,并含有坏死灶。第 5 天时将上述活胚 4 ℃冷却,无菌收取胚体及尿囊液,可用于传代和鉴定。

6.4.2 病毒的鉴定

将上述胚体和尿囊液进行荧光 RT-PCR 试验(见第 7 章)或琼脂扩散试验(见第 8 章)来确定是否含有鸡病毒性关节炎病毒。

6.5 病毒分离培养与鉴定——细胞培养

6.5.1 接种培养

将 5.2~5.5 中制备的样品接种于已培养 1 d 的单层敏感细胞(如鸡胚肾细胞、成纤维细胞、幼仓鼠肾传代细胞),37 ℃培养箱中培养 3 d~5 d,用 0.25%的胰酶消化后收集细胞,转入新培养瓶中传代再培养 3 d~5 d。

6.5.2 病毒的鉴定——间接免疫荧光抗体反应(IFA)

6.5.2.1 样品制备与染色

将 6.5.1 所述感染病变细胞用 0.25%的胰酶消化,PBS 洗涤 3 次,用适量 PBS 悬浮细胞,将细胞悬

SN/T 1173—2015

液滴于玻片上。同时用同批未感染病毒细胞作正常细胞对照。滴加的细胞以细胞铺开、不重叠为宜。室温干燥后,冷丙酮固定 10 min。PBS 漂洗后,充分干燥。

将适当稀释的阴性、阳性血清分别滴加于病变细胞片及正常细胞片上,置湿盒内,37℃作用 30 min~45 min,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,室温干燥,取适当稀释的荧光抗体,滴加于玻片上,置湿盒内,37℃作用 30 min~45 min,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,50%甘油 PBS 封片,荧光显微镜下观察。

6.5.2.2 镜检与结果报告

在阴性、阳性对照血清成立的条件下,即阴性血清与正常细胞和病毒感染细胞反应均无荧光;阳性血清与正常细胞反应无荧光,与病毒感染细胞反应有荧光反应,若待检样被感染的细胞内呈现亮绿色荧光,则病毒培养液中含有鸡病毒性关节炎病毒。

7 实时荧光 RT-PCR 试验

7.1 试剂与材料

RNA 提取液(Trizol)、三氯甲烷、异丙醇、无水乙醇、实时荧光 RT-PCR 反应缓冲液、反转录酶、DNA 聚合酶、引物、探针、DEPC 水等。

7.2 仪器与设备

高速台式冷冻离心机、涡旋振荡器、实时荧光 PCR 仪等。

7.3 样品采集与处理

见 5.2~5.5。

7.4 RNA 的提取

在样品处理区进行(也可采用其他等效的 RNA 提取试剂盒)。所有 RNA 提取器皿用 DEPC 水浸泡 24 h,灭菌后方可使用。

取 n 个 1.5 mL 灭菌离心管,其中 n 为待检样品数、一管阳性对照及一管阴性对照之和,并编号。

每管加入 750 μ L Trizol,然后分别加入待检样品、阳性对照和阴性对照各 250 μ L,混匀,静置 5 min,再加入 200 μ L 三氯甲烷,混匀,静置 5 min,于 4℃条件下,12 000 r/min 离心 15 min。

取相同数量的 1.5 mL 灭菌离心管,加入 500 μ L 异丙醇(-20℃预冷),吸取离心后各管中的上清液转移至相应的新管中,上清液吸取约 500 μ L(注意不要吸出白色絮状物),颠倒均匀。

于 4℃条件下,12 000 r/min 离心 15 min。取出离心管,轻轻倒去上清液,加入 1 mL 75%乙醇,颠倒洗涤。

于 4℃条件下,12 000 r/min 离心 15 min。取出离心管,轻轻倒去上清液,倒置于吸水纸上,吸干液体,不同样品应在吸水纸不同地方吸干。

每管加入 20 μ L 灭菌 DEPC 水,轻轻混匀,溶解管壁上的 RNA,2 000 r/min 离心 5 s,冰上保存备用。

7.5 实时荧光 RT-PCR 反应

7.5.1 扩增引物序列及探针序列

采用以下引物扩增病毒 S 基因中的特异性核苷酸序列:

上游引物:5'-CGTTCCCTGTGGACGTATCA-3';

下游引物:5'-GAGTACACCCCATACGCTTGGT-3'。
探针:5'-FAM-CACCCGCGATTCTGCGACTCATG-ECLIPSE-3'

7.5.2 实时荧光 RT-PCR 扩增反应体系

实时荧光 RT-PCR 反应体系为 25 μL,按表 1 配制反应体系。也可选用商业的荧光 PCR 反应预混液。

表 1 实时荧光 RT-PCR 反应体系配置表

试剂	体积/μL
2×real time RT PCR 缓冲液	12.5
DNA 聚合酶(5 U/μL)	0.5
反转录酶(5 U/μL)	0.5
上、下游引物(20 μmol/L)	各 0.5
FAM 标记的探针(10 μmol/L)	0.5
模板	5
DEPC 水	5

7.5.3 实时荧光 RT-PCR 反应程序

将上述加样好的 PCR 管放入扩增仪内,记录样本摆放顺序。按以下条件进行扩增:45 ℃ 30 min; 94 ℃ 10 s,60 ℃ 45 s(收集荧光信号),40 个循环;4 ℃ 10 s。也可参照商业试剂盒说明书进行。
检测过程中分别设阳性对照、阴性对照和空白对照。

7.6 结果判定

在实时荧光 RT-PCR 反应阳性对照 Ct 值小于 30.0,并有典型扩增曲线;阴性对照和空白对照无 Ct 值且无扩增曲线,则实验成立。在实验成立情况下,被检样品进行检测时:
a) 如 Ct 值≤35.0,则判定为被检样品阳性,扩增靶标序列参见附录 B。
b) 如 Ct 值≥40.0,则判定为被检样品阴性。
c) 如 35.0<Ct 值<40.0,则重复一次。如再次扩增后 Ct 值仍为<40.0,则判定被检样品阳性;如再次扩增后 Ct 值≥40.0,则判定被检样品阴性。
注:如有进一步确认要求,可对产物进行测序,PCR 产物序列参见附录 B。

8 琼脂凝胶免疫扩散试验

8.1 试剂与材料

磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、叠氮钠、氯化钠和琼脂糖等,均为分析纯。
鸡病毒性关节炎琼扩抗原、标准阳性血清。
平皿或玻璃板、量筒、三角瓶、打孔器、微量移液器和吸头等。

8.2 仪器与设备

培养箱、分析天平、冰箱(2 ℃~8 ℃)等。

SN/T 1173—2015

8.3 样品前处理

按常规方法采血分离血清。样品应无溶血,无细菌污染。保存于 4℃。

8.4 操作方法

8.4.1 制备琼脂板

称取琼脂 0.9 g,叠氮钠 0.1 g,用 pH 7.2,0.01 mol/L PBS(配方见附录 C)定容至 100 mL,沸水浴中至充分融化,冷却至 60℃~65℃时,将洁净的平皿或玻璃板置于平台上,倒入琼脂溶液,使琼脂凝胶厚度约达 3 mm,待琼脂冷却凝固后,放入湿盒中,4℃冰箱保存备用。

8.4.2 打孔

在上述制备的琼脂凝胶上,按图 1 所示打孔,孔径为 3 mm~4 mm,孔距为 3 mm。用针头轻轻挑出孔中的琼脂,保持孔边完好无损。

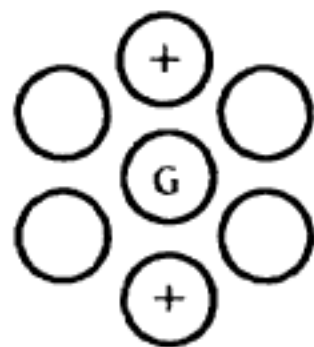


图 1

8.4.3 封底

用酒精灯轻烤平皿或玻璃板底部,封闭孔的底部,以防侧漏。

8.4.4 加样

用微量移液器吸取鸡病毒性关节炎琼扩抗原悬液加到“G”孔中,标准阳性血清对照加入“+”孔中,被检血清按照顺序分别加入其余各孔中,每孔均以加满不溢为度。

8.4.5 感作

将平皿加盖保湿,放于 37℃温箱内作用 24 h~72 h,分别于 24 h、48 h 和 72 h 观察并记录结果。

8.5 结果判定

将琼脂板置日光灯或侧强光下观察,若标准阳性血清与抗原孔之间出现一条清晰致密的白色沉淀线,标准阴性血清与抗原孔之间不出现沉淀线,则试验成立,否则视为无效。

阳性结果:被检血清孔与中心抗原孔之间出现清晰的沉淀线,且该线和抗原与标准阳性血清之间沉淀线的末端相吻合。

弱阳性结果:被检血清孔与中心孔之间不出现沉淀线,标准阳性血清的沉淀线一端向被检血清孔内侧弯曲,则此孔的被检样品判为弱阳性,重复试验,仍为弱阳性者判为阳性。

阴性结果:被检血清孔与中心孔之间不出现沉淀线,且标准阳性血清沉淀线直向被检血清孔,则被检血清判为阴性。被检血清孔与中心抗原孔之间的沉淀线粗而混浊或与标准阳性血清孔的沉淀线交叉并直伸,则被检血清孔为非特异性反应,应重做,若仍出现非特异性反应则判为阴性。

9 酶联免疫吸附试验

9.1 试剂与材料

包被液、洗涤液、封闭液、底物液、终止液：配方见附录 C。

鸡病毒性关节炎 ELISA 抗原、辣根过氧化物酶标记的抗鸡免疫球蛋白 G(IgG-HRP)、阳性参考血清和阴性参考血清。

也可等同采用商业化试剂盒检测。

9.2 仪器与设备

聚苯乙烯微量反应板、酶标检测仪、温箱、微量移液器、滴头等。

9.3 样品采集

按常规方法采血分离血清。样品应无溶血，无细菌污染。保存于 4℃。

9.4 操作步骤

9.4.1 包被

将鸡病毒性关节炎 ELISA 抗原用包被液稀释到工作浓度，每孔加 100 μL ，置 37℃ 温箱作用 1 h 后再置 4℃ 过夜后备用。

9.4.2 洗涤

甩干包被液，每孔加封闭液 200 μL ，置 37℃ 温箱封闭 90 min，甩干后用洗涤液洗涤 3 次，甩干。

9.4.3 吸附

将待检血清用稀释液作 100 倍稀释，每孔加 100 μL ，每份血清作两孔，置 37℃ 温箱作用 1 h，甩干后用洗涤液洗涤 5 次，甩干。同时加入阳性参考血清和阴性参考血清各两孔。

9.4.4 加酶标二抗

将抗鸡酶标抗体用稀释液稀释到工作浓度，每孔加 100 μL ，置 37℃ 温箱作用 1 h，甩干后用洗涤液洗涤 5 次，甩干。

9.4.5 加底物

每孔加新配制的底物溶液 100 μL ，避光 37℃ 反应 5 min。

9.4.6 加终止液

每孔加入 2 mol/L 硫酸溶液 50 μL ，终止反应。

9.4.7 测定 OD 值

用酶标仪在波长 450 nm 处测定各孔的 OD 值，必须在加入终止液后 30 min 内完成。

9.5 结果判定

当标准阳性血清与标准阴性血清的 OD 值比值大于 2 时，试验成立。待检样品的 P/N 值按式(1)

计算：

$$P/N = \frac{\text{待检血清孔 OD 值}}{\text{标准阴性血清 OD 平均值}} \dots\dots\dots(1)$$

$P/N \geq 2$ 为阳性； $P/N < 1.5$ 为阴性； $1.5 \leq P/N < 2$ 时为可疑，重复后仍大于 1.5 判为阳性。

附 录 A

(资料性附录)

病原学及组织学病理变化

A.1 病原学

鸡病毒性关节炎病毒(AVAV)属于呼肠孤病毒科(*Reoviridae*)正呼肠孤病毒属(*Orthoreovirus*)禽呼肠孤病毒(*Avian reoviruses*)的成员之一,该病毒呈二十面体对称排列,有双层衣壳结构,病毒粒子呈六角形,无囊膜,直径约为 75 nm,在氯化铯中的浮密度为 1.36 g/mL~1.37 g/mL。一般无血凝特性。

禽呼肠孤病毒的基因组是由 10 个节段的双链 RNA 构成。其中正链基因节段的 5' 有帽子结构,而且每个 dsRNA 节段的 3' 均露出羟基,10 个基因节段可编码 11 种蛋白产物,其中有 8 种蛋白是结构蛋白(L1、L2、L3、M1、M2、S1、S2、S4),3 种蛋白是非结构蛋白(μ NS、 σ NS 和 σ 1S)。其中 μ NS 由 M3 节段编码, σ NS 由 S3 节段编码, σ 1S 由 S1 节段编码。8 种结构蛋白分别是外衣壳蛋白和内衣壳蛋白,其中 L2、M2、S1、S4 编码的是外衣壳蛋白,L1、L3、M1、S2 编码的是内衣壳蛋白。

禽呼肠孤病毒对热有一定的抵抗能力,能耐受 60 °C 达 8 h~10 h。对乙醚不敏感。对 H₂O₂、2% 来苏尔、3% 福尔马林等均有抵抗力。用 70% 乙醇和 0.5% 有机碘可以灭活病毒。呼肠孤病毒可通过卵黄囊和绒毛尿囊膜接种而在鸡胚中生长繁殖。通过卵黄囊接种,一般在接种后 3 d~5 d 鸡胚死亡;通过绒毛尿囊膜接种,通常在接种后 7 d~8 d 鸡胚死亡。除鸡胚之外,呼肠孤病毒还可在原代鸡胚成纤维细胞、肝、睾丸细胞,以及 vero、BHK-21 等传代细胞中生长。禽呼肠孤病毒可感染鸡、火鸡、鸭、鹅、鸚鵡和其他禽类,既可水平传递也可经卵传递。病毒感染鸡之后,首先在呼吸道和消化道复制后进入血液,24 h~48 h 后出现病毒血症,随后即向体内各组织器官扩散,以关节腱鞘及消化道的含毒较高。排毒途径主要经消化道。

A.2 组织学病理变化

在急性期出现水肿、凝固性坏死,异嗜细胞集聚血管周围浸润,网状细胞增生,最后引起腱鞘壁层明显增厚,滑膜腔充满异嗜细胞和脱落的滑膜细胞,随着破骨细胞增生而形成骨膜炎。在慢性期,滑膜形成绒毛样突起,并有淋巴样结节,炎症出现一段时间之后,大量纤维组织增生,明显见到网状细胞、淋巴细胞、巨噬细胞和浆细胞的浸润或增生。趾关节和跗关节区也出现相同的一般炎症反应。心肌纤维之间的异嗜细胞浸润是此病较为恒定的变化。有些病例伴有单核细胞或网状细胞的增生。肝脏的病变有时也较为明显,主要表现为大小不一的出血灶和肝细胞坏死灶,在坏死灶的周围有异染性细胞和淋巴细胞的浸润。红细胞、血细胞容积和白细胞总数一般在正常范围内,异嗜细胞百分比稍有增加,但淋巴细胞百分比下降。

附 录 B

(资料性附录)

实时荧光 RT-PCR 扩增核苷酸参考序列

CTGCGTCGTT CCCTGTGGAC GTATCATTCA CCCGCGATTC TGCGACTCAT GCGTAC
CAAG CGTATGGGGT GTACTC

附 录 C
(规范性附录)
试剂配方

C.1 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(PBS,pH 7.2)

磷酸二氢钠	0.2 g
磷酸氢二钠	2.9 g
氯化钾	0.2 g
调 pH 至	7.2
加蒸馏水至	1 000 mL

115 kPa、20 min 高压灭菌,4 ℃保存备用。

C.2 包被液(0.05 mol/L pH 9.6 碳酸盐缓冲液)

碳酸钠($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)	1.2 g
碳酸氢钠(NaHCO_3)	1.46 g

加蒸馏水或去离子水至 500 mL,充分溶解,现配现用。

C.3 洗涤液(0.01 mol/L pH 7.4 PBS 0.05%吐温-20)

氯化钠	4.0 g
磷酸二氢钾	0.1 g
十二水磷酸氢二钠	1.45 g
氯化钾	0.1 g
吐温-20	0.25 mL
水	500 mL

溶解后置于 4 ℃冰箱备用。

C.4 稀释液

牛血清白蛋白	3 g
洗涤液	100 mL

置于 4 ℃冰箱备用。

C.5 50%甘油磷酸盐缓冲溶液

甘油	5 mL
PBS(0.01 mol/L,pH 7.2)	5 mL

C.6 乙酸-柠檬酸缓冲液(pH 6.0)

乙酸钠(A液):		
乙酸钠		1.64 g
水		200 mL
溶解后置于 4 ℃ 冰箱备用。		
柠檬酸(B液):		
柠檬酸		2.1 g
水		100 mL
溶解后置于 4 ℃ 冰箱备用。		

C.7 TMB 溶液

TMB		350 mg
甲醇		100 mL
加温溶解后于暗盒中存室温。		

C.8 底物液(临用前配制)

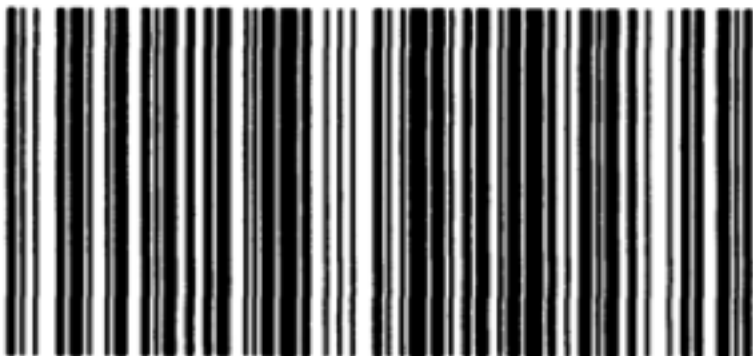
PH6.0 乙酸-柠檬酸缓冲液(37 ℃)		9.7 mL
TMB 溶液		300 μL
H ₂ O ₂		7 μL

C.9 封闭液

1%牛血清白蛋白的洗涤液。

C.10 终止液(2 mol/L H₂SO₄)

浓硫酸		22.2 mL
水		177.8 mL



SN/T 1173-2015

书号:155066 • 2-30288
定价: 18.00 元