

## 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

青岛立见诊断技术发展中心 提供下载 [www.ljdiagn.com](http://www.ljdiagn.com)

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。

青岛立见诊断技术发展中心 提供下载 [www.qdregen.com](http://www.qdregen.com)

# 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*)、 $\alpha$ -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: reverse 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

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使用含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。

### 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  $\mu$ L,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  $\mu$ L,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  $\mu$ L 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  $\mu$ L,置于 37℃ 30 min。

#### 6.3.2.6 终止反应

每孔加终止液 50  $\mu$ L,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  $\leq 0.2$  为正常反应。按以下两个条件判定结果: $P/N$  值  $\geq 2$ ,且被检抗原两孔平均 OD 值  $\geq 0.2$  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。

## 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<sup>®</sup> 试剂、核糖核酸酶(RNase)抑制剂(40 U/ $\mu$ L)、反转录酶(M-MLV)(200 U/ $\mu$ L)、dNTPs 混合物(各 10 mM)、无 RNase dH<sub>2</sub>O、EmeraldAmp<sup>™</sup> PCR Master Mix(2 $\times$ )、DL2 000 DNA Marker、10 $\times$ 或 6 $\times$ 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<sub>2</sub>EDTA)、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  $\mu$ mol/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  $\mu$ mol/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 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 保存时不应超过 24 h,长期保存应分装成小管,置于-70 $^{\circ}$ C 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  $\mu$ L 于无 RNA 酶的灭菌离心管(1.5 mL)中,加入 500  $\mu$ L RNA 提取液(TRIzol<sup>®</sup> Reagent),充分混匀,室温静置 10 min;加入 500  $\mu$ L 三氯甲烷,充分混匀,室温静置 10 min,4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 10 min,取上清(500  $\mu$ L)于新的离心管(1.5 mL)中,加入 1.0 mL 异丙醇,充分混匀,-20 $^{\circ}$ C 静置 30 min,4 $^{\circ}$ C 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  $\mu$ L 无 RNase dH<sub>2</sub>O 溶解沉淀,瞬时离心,进行 cDNA 合成或置于-70 $^{\circ}$ C 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  $\mu$ L 体系中进行。取 6.4.4 制备的总 RNA 12.5  $\mu$ L 于无 RNA 酶的灭菌离心管(1.5 mL)中,加入 1  $\mu$ L 反转录引物(ORF3RL)混匀,70 $^{\circ}$ C 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  $\mu$ L 5 $\times$ M-MLV 缓冲液、1  $\mu$ L dNTPs 混合物(各 10 mmol/L)、0.5  $\mu$ L RNase 抑制剂、1.0  $\mu$ L 反转录酶 M-MLV 混匀,42 $^{\circ}$ C 保温 1 h;最后,70 $^{\circ}$ C 保温 15 min 后冰上冷却,得到 cDNA 溶液,立即使用或置于-20 $^{\circ}$ C 保存。

### 6.4.6 PCR 反应

#### 6.4.6.1 反应体系(25 $\mu$ L)

2 $\times$ EmeraldAmp <sup>™</sup> PCR Master Mix	12.5 $\mu$ L
ORF3U	0.5 $\mu$ L
ORF3L	0.5 $\mu$ L
模板(cDNA)	2 $\mu$ L
无菌双蒸水加至	25 $\mu$ L

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

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<sub>50</sub>~1 000 TCID<sub>50</sub>)、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<sup>5</sup> 个细胞/mL~3×10<sup>5</sup> 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<sup>-6</sup> 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。

## 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  $\mu\text{L}$ ,置于 4 $^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{L}$ 。每块反应板设阳性、阴性血清及稀释液对照各两孔,每孔 100  $\mu\text{L}$ ,盖好包被板置 37 $^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{L}$ ,置于 37 $^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{L}$ ,在 37 $^{\circ}\text{C}$  湿盒内反应 5 min~10 min。

### 6.6.2.6 终止反应

每孔加终止液 50  $\mu\text{L}$ 。

## 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  $\leq 0.162$  为正常反应,OD 值  $\geq 0.200$  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  $\geq 2$  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。



**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( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )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( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  链霉素,用 5.6%碳酸氢钠( $\text{NaHCO}_3$ )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  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  胰酶;

100 IU/mL 青霉素;

100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  链霉素;

以 5.6%碳酸氢钠( $\text{NaHCO}_3$ )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( $\text{NaOH}$ )调节 pH 至 7.0~7.2,过滤后置 4℃备用。

**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。

青岛立见诊断技术发展中心 提供下载 [www.qdregen.com](http://www.qdregen.com)

**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  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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。

附录 D  
(资料性附录)  
RT-PCR

D.1 TAE 电泳缓冲液(pH 8.5)的配制

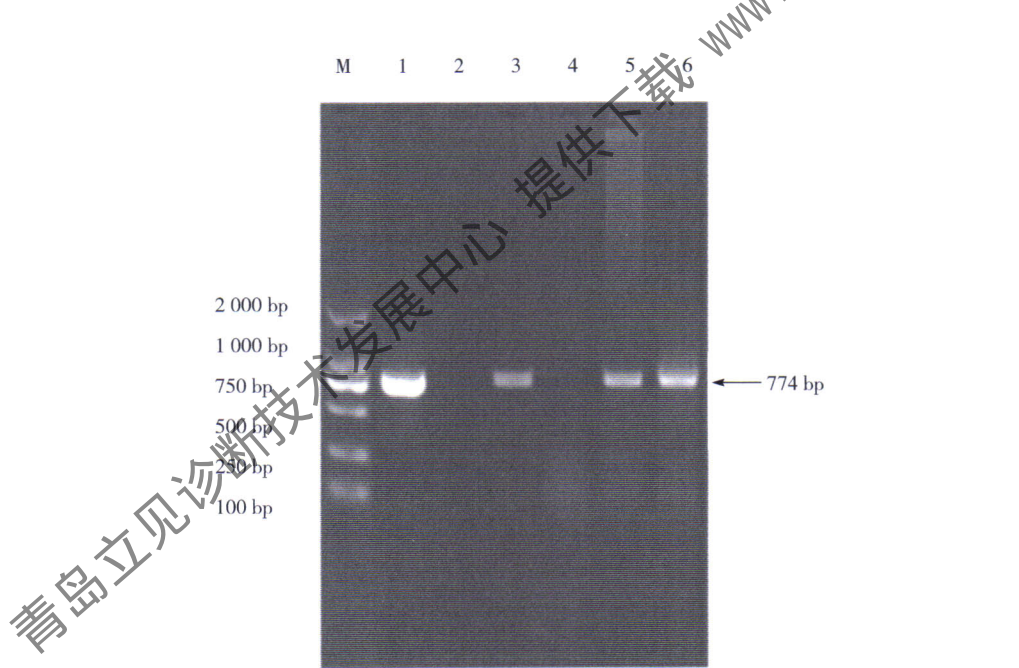
50×TAE 电泳缓冲液储存液:

三羟甲基氨基甲烷(Tris 碱)	242 g
乙二胺四乙酸二钠(Na <sub>2</sub> EDTA)	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