

版权所有 · 禁止翻制、电子发售



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1166—2010

代替 SN/T 1166.1—2002, SN/T 1166.2—2002, SN/T 1166.3—2006

水泡性口炎检疫技术规范

Quarantine protocol for vesicular stomatitis

2010-11-01 发布

2011-05-01 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。

本标准代替 SN/T 1166.1—2002《水泡性口炎补体结合试验操作规程》、SN/T 1166.2—2002《水泡性口炎微量血清中和试验操作规程》和 SN/T 1166.3—2006《水泡性口炎逆转录聚合酶链反应操作规程》。

本标准与 SN/T 1166.1—2002、SN/T 1166.2—2002 和 SN/T 1166.3—2006 相比，主要技术变化如下：

- 增加了水泡性口炎的病毒分离及鉴定；
- 增加了荧光反转录聚合酶链反应；
- 增加了竞争酶联免疫吸附试验。

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、中华人民共和国云南出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：花群义、阮周曦、杨俊兴、杨云庆、秦智锋、吕建强、曾少灵、林庆燕、宗卉、张彩虹、周晓黎、董俊。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

- SN/T 1166.1—2002；
- SN/T 1166.2—2002；
- SN/T 1166.3—2006。

水泡性口炎检疫技术规范

1 范围

本标准规定了动物水泡性口炎的病毒分离及鉴定、反转录聚合酶链反应、荧光反转录聚合酶链反应、中和试验、竞争酶联免疫吸附试验的技术要求。
本标准适用于动物水泡性口炎的检验检疫。

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 18088 出入境动物检疫采样

3 缩略语

以下缩略语适用于本文件。
BHK-21:仓鼠肾细胞
BLP:乳糖蛋白胨缓冲肉汤
CPE:致细胞病变作用
Ct 值:每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数
c-ELISA:竞争酶联免疫吸附试验
DEPC:焦碳酸二乙酯
McAb:单克隆抗体
OD 值:光密度值
PI:抑制百分比
TCID₅₀:半数组织培养感染量
Vero:非洲绿猴肾细胞
VSV:水泡性口炎病毒
VSV-IND:水泡性口炎病毒印地安那型
VSV-NJ:水泡性口炎病毒新泽西型

4 病毒分离与鉴定

4.1 病毒分离

4.1.1 样品的采集:按 GB/T 18088 进行。主要采集动物口、蹄冠上或乳头上的水泡上皮组织。采集后立即冷藏送检或置碳酸缓冲甘油(配方见附录 A)中低温保藏。采集到的水泡液置灭菌瓶中,冷藏送检或低温保藏。若从冻肉中采样,可采淋巴结或组织;采集的精液样品应不少于 1 mL,冻精样品每头每批次取样 3 管~5 管;无症状或无水泡的活动物采集抗凝全血,胚胎及其冲洗液。
4.1.2 样品的处理:将采集到的上皮、淋巴结或组织样品,经研磨后用 0.01 mol/L pH7.2 的 PBS(配

制见附录 A)配制成 20% 的悬液。精液用乳糖蛋白胨缓冲肉汤(BLP,配制见附录 A)作 1 : 5 稀释后,经 8 000 r/min 4 ℃离心 30 min,弃上清液,并弃去浮游脂肪,再用 BLP 作 1 : 5 稀释成悬液;水泡液、胚胎冲洗液无需处理,全血用 BLP 作 1 : 5 稀释后,直接用于病毒的分离或鉴定。

4.1.3 接种细胞:澄清组织悬液或水泡液与抗生素(含青霉素 2 000 IU/mL、链霉素 2 000 μg/mL) 4 ℃作用 30 min,接种于 BHK-21 或 Vero 细胞单层,37 ℃ 5%二氧化碳培养箱吸附 1 h,弃去接种物,用细胞培养液洗涤三次,然后加入维持液,置于 33 ℃~35 ℃ 5%二氧化碳培养箱中继续培养。

4.2 病毒鉴定

采用反转录聚合酶链反应和荧光反转录聚合酶链反应进行病毒分离物的鉴定。接种后 2 d~3 d 出现 CPE,需进行鉴定。如无 CPE,则盲传三代,仍无 CPE,则判为 VSV 阴性。

5 反转录-聚合酶链反应

5.1 试剂和材料

5.1.1 水泡性口炎病毒标准株

新泽西型(NJ)和印第安那型(IND)标准病毒株。

5.1.2 *Taq* 酶

—20 ℃保存,避免反复冻融或温度剧烈变化。

5.1.3 逆转录酶 AMV

—20 ℃保存,避免反复冻融或温度剧烈变化。

5.1.4 RNA 抑制剂(RNasin)

—20 ℃保存,避免反复冻融或温度剧烈变化。

5.1.5 dNTP(含 dCTP、dGTP、dATP、dTTP 各 10 mmol/L)

5.1.6 引物

5.1.6.1 选用水泡性口炎病毒 L 蛋白基因较保守的序列为 PCR 扩增区。采用半套式 RT-PCR 方法,半套式引物分别根据 NJ 株和 IND 株扩增区的碱基差别设计。外侧引物 I (P1):5' AAG GCT CTC TGT TTC CGG ATC TGG 3';外侧引物 II (P2):5' TGA TTC AAT ATA ATT ATT TTG GGA C 3';NJ 半套式引物(P3):5' TGT TCT GGT GTG CAA ACC AGG TAT C 3';IND 半套式引物(P4):5' AGT AGA ACT GTG CAA GCC CGG TAT C 3'。

5.1.6.2 用 DEPC 水将引物配制成浓度为 25 pmol/μL。

5.1.7 三氯甲烷(氯仿)。

5.1.8 75%乙醇:用新开启的无水乙醇和 DEPC 水配制,—20 ℃预冷。

5.1.9 异戊醇:使用前预冷到—20 ℃。

5.1.10 变性液、5 倍 AMV 逆转录酶浓缩缓冲液、*Taq* 酶用 10 倍浓缩缓冲液、TBE 电泳缓冲液、EB 核酸染色液、上样缓冲液、DEPC 处理水等。配制方法见附录 A。

5.2 器材和设备

PCR 扩增仪、电泳仪、微量移液器及吸头、凝胶图像分析仪、恒温培养箱、普通冰箱和低温冰箱、电动匀浆器或组织研磨器、离心机和离心管等。

5.3 操作方法

5.3.1 被检样品的采集和处理

5.3.1.1 被检样品的采集:样品主要采集动物口、蹄冠上或乳头上的水泡上皮组织,采集后立即冷藏送

检或置缓冲甘油(用 0.01 mol/L pH7.2 的 PBS 配制的 50% 的甘油溶液)中低温保藏;采集到的水泡液置灭菌瓶中,冷藏送检或低温保藏;若从冻肉中采样,可采集淋巴结或组织;无症状或无水泡的活动物采集抗凝全血。

5.3.1.2 被检样品的处理:将采集到的上皮、淋巴结或组织样品,经研磨后用 0.01 mol/L pH7.2 的 PBS 配制成 20% 的悬液。全血、胚胎及其冲洗液、细胞培养物无需处理;取 450 μ L 样品悬液放入 1.5 mL 的离心管,再加入 450 μ L 变性液并混匀,旋涡振荡混合 20 s,冰浴 15 min。

5.3.2 对照样品制备和处理

5.3.2.1 阳性对照样品制备:将水泡性口炎病毒 NJ 型和 IND 型分别接种 BHK-21 或 Vero 细胞单层,37 $^{\circ}$ C 吸附 1 h 后加入维持液,置 5% 二氧化碳培养箱 37 $^{\circ}$ C 培养,逐日观察。待 CPE 达 75% 以上,冻融两次,收获细胞培养病毒悬液,分装成 1 mL 小瓶,置-70 $^{\circ}$ C 保存备用。

5.3.2.2 阴性对照样品制备:制备 BHK-21 或 Vero 细胞单层,弃去细胞培养液,加入维持液,置 5% 二氧化碳培养箱 37 $^{\circ}$ C 培养 3 d,冻融两次,收获细胞悬液,分装成 1 mL 小瓶,置-70 $^{\circ}$ C 保存备用;或采集相同动物的组织样品作为阴性对照样品。

5.3.2.3 对照样品的处理:取 450 μ L 阳性和阴性对照样品细胞悬液放入 1.5 mL 的离心管,再加入 450 μ L 变性液并混匀,旋涡振荡混合 20 s,冰浴 15 min。

5.3.3 RNA 提取

5.3.3.1 取 250 μ L 处理后的样品置 1.5 mL eppendorf 管中,作好标记,同时设立阳性样品、阴性样品对照,加入 3 倍体积 Trizol,振荡混合 20 s,静置 5 min。

5.3.3.2 加入 200 μ L 三氯甲烷,振荡混合 20 s,静置 5 min;4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液置另一个标记好的 1.5 mL eppendorf 管中,加入等体积异丙醇,-20 $^{\circ}$ C 静置 15 min。

5.3.3.3 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 15 min,轻轻弃上清液,加 1 mL DEPC 水配制的 75% 乙醇。

5.3.3.4 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 15 min,小心弃去乙醇,倒置滤纸上,烘干,加 20 μ L DEPC 水溶解,立即进行 cDNA 的合成或-80 $^{\circ}$ C 保存备用。

5.3.3.5 RNA 提取也可采用等效的商品化病毒 RNA 提取试剂盒制备 RNA。

5.3.4 反转录合成 cDNA

在 PCR 管中加入 10 μ L 反转录模板(样品 RNA)、1 μ L 引物 P2、5 μ L 5 倍逆转录酶浓缩缓冲液、2 μ L dNTP、0.5 μ L RNA 酶抑制剂(20 U)、1 μ L 逆转录酶 AMV(10 U)和 0.5 μ L 水,总体积为 20 μ L。置于 42 $^{\circ}$ C 反转录 45 min,立即冰浴,用作 PCR 模板。

5.3.5 PCR 扩增 DNA

5.3.5.1 50 μ L PCR 反应液组成

10 $\times$ <i>Taq</i> 酶缓冲液	5 μ L
氯化镁(MgCl ₂)(25 mmol/L)	4 μ L
dNTPs(2.5 mmol/L)	4 μ L
引物 P1	1 μ L
引物 P2	1 μ L
<i>Taq</i> 酶(5U)	1 μ L
cDNA 模板	5 μ L
DEPC 水	29 μ L

5.3.5.2 PCR 循环参数

将 PCR 反应管置于 PCR 扩增仪。94 ℃ 5 min; 94 ℃ 45 s, 55 ℃ 45 s, 72 ℃ 30 s, 40 次循环, 然后 72 ℃ 7 min, 最后 4 ℃ 保存。

5.3.6 PCR 产物琼脂糖电泳

用 TBE 电泳缓冲液配制 2% 的琼脂糖(含 0.5 μg/mL EB)平板。将平板放入水平电泳槽, 使电泳缓冲液刚好淹没胶面。将 8 μL 样品和 2 μL 样品缓冲液混匀后加入样品孔。在电泳时设立 DNA 标准分子量作对照, 推荐使用 pUC19 DNA/*Msp* I (*Hpa* II)。5 V/cm 电泳约 30 min, 当溴酚蓝到达底部时停止。在紫外灯下观察有无 227 bp 的 DNA 片段扩增产物条带。

5.3.7 半套式 PCR 定型

5.3.7.1 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳后, 如果看不到 227 bp 的 DNA 条带, 取 5 μL 产物做模板; 如果电泳后能看到 227 bp 的 DNA 带, 只是要求进行定型, 则需将产物按 1 : 1 000 稀释后, 取 5 μL 做模板。

5.3.7.2 取两只离心管, 一管作新泽西型(NJ); 另一管作印第安那型(IND):

- a) 新泽西型(NJ)定型的 PCR 反应管中依次分别加入以下试剂, 配制 50 μL PCR 反应体系: 模板(PCR 产物)5 μL, *Taq* 酶(5 U)1 μL, dNTPs(2.5 mmol/L)2 μL, 引物 P2 1 μL, 引物 P3 (NJ 型)1 μL, 10×*Taq* 酶缓冲液 5 μL, MgCl₂(25 mmol/L)6 μL, DEPC 水 29 μL;
- b) 印第安那型(IND)定型的 PCR 反应管中依次分别加入以下试剂, 以配制 50 μL PCR 反应体系: 模板(PCR 产物)5 μL, *Taq* 酶 1 μL(5 U)、dNTPs(2.5 mmol/L)2 μL、引物 P2 1 μL、引物 P4(IND 型)1 μL, 10×*Taq* 酶缓冲液 5 μL, 25 mmol/L 的 MgCl₂ 6 μL、DEPC 水 29 μL。

5.3.7.3 将 PCR 反应管置于 PCR 扩增仪。94 ℃ 4 min; 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 45 s, 72 ℃ 45 s, 30 次循环, 然后 72 ℃ 5 min, 最后 4 ℃ 保存。

5.3.7.4 如同 5.3.6, 用 TBE 电泳缓冲液配制 2% 的琼脂糖(含 0.5 μg/mL EB)平板进行电泳检测。

5.3.8 设立对照

5.3.8.1 从 5.3.3 RNA 抽提开始, 就应设立阳性对照、阴性对照。以含有已知新泽西型(NJ)和印第安那型(IND)病毒株的细胞悬液作为阳性对照, 用正常的 BHK-21 或 Vero 细胞悬液作为阴性对照。

5.3.8.2 只有在对照成立的情况下, 试验有效, 可进行结果判定。

5.4 结果判定

5.4.1 PCR 后阳性对照会出现一条 227 bp 的 DNA 片段。阴性对照没有该核酸带。

5.4.2 半套式 PCR 后, 与引物相应的血清型病毒的阳性对照会出现一条 119 bp 的 DNA 片段。阴性对照没有该核酸带。

5.4.3 待测样品 PCR 扩增后, 如能在相应 227 bp DNA 位置上有带, 即可作出定性。半套式 PCR 后如出现一条 119 bp 的 DNA 片段, 即可定型为与引物相应的血清型。

5.4.4 必要时对扩增产物进行序列测定, 参考序列参见附录 B。

6 荧光 RT-PCR 检测方法

6.1 仪器与器材

6.1.1 荧光 PCR 检测仪。

6.1.2 高速台式冷冻离心机(离心速度 12 000 r/min 以上)。

- 6.1.3 台式离心机(离心速度 3 000 r/min)。
- 6.1.4 混匀器。
- 6.1.5 冰箱(2 ℃~8 ℃和-20 ℃两种)。
- 6.1.6 微量可调移液器(5 μL、10 μL、100 μL、1 000 μL)及配套带滤芯吸头。
- 6.1.7 Eppendorf 管(1.5 mL)、透明薄壁 PCR 管(0.2 mL)。

6.2 试剂

- 6.2.1 三氯甲烷、异丙醇、75%乙醇:同 5.1。
- 6.2.2 引物:上游引物为 5'-ATGGCTCCTACAGTTAAGAGAATCA-3',下游引物为 5'-TGAAG-TAATCAGCCGGGTATTC-3'。
- 6.2.3 荧光双标记探针(10 μmol/L):(FAM)5'-CGAAATTACCGGCCA ACGAGGATC-3'(TAMAR)。

6.3 操作方法

6.3.1 被检样品的采集和处理

同 5.3.1。

6.3.2 对照样品制备和处理

同 5.3.2。

6.3.3 RNA 提取

同 5.3.3。

6.3.4 荧光 RT-PCR 检测步骤

6.3.4.1 荧光 RT-PCR 反应液的配制:在反应混合物配制区进行。设所需荧光 RT-PCR 检测总数为 $N(N=U+2+1)$,其中 U 为被检样品数、2 为刚性对照数、1 为阴性对照数,按表 1 配制反应体系混合液,配制在冰盒中进行。也可采用市售的商品化一步法荧光 RT-PCR 反应液配制或分装。

表 1 反应体系混合液配制

组 分	每管用量 μL	N 管总用量 μL
AMV 反转录酶(5 U/μL)	1	$N\times 1$
dNTPs(每种均为 10 mmol/L)	5	$N\times 5$
RNAsin(40 U/μL)	1	$N\times 1$
Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)	0.5	$N\times 0.5$
反转录和 PCR 缓冲液(5×)	10	$N\times 10$
MgCl ₂ (25 mmol/L)	6	$N\times 6$
上游引物(15 μmol/L)	1	$N\times 1$
下游引物(15 μmol/L)	1	$N\times 1$
探针(10 μmol/L)	1	$N\times 1$
DEPC 水	13.5	$N\times 13.5$
总体积	40	$N\times 40$

- 6.3.4.2 荧光 RT-PCR 反应液分装:将 6.3.4.1 配制的荧光 RT-PCR 反应液充分混合均匀,按每管 40 μ L 分装于 0.2 mL 透明荧光 PCR 管,荧光 PCR 管放于 96 孔板上,一定要按顺序记录好被检样品管、阳性对照管、阴性对照管。转移至样本处理区。
- 6.3.4.3 加样:在样本处理区进行。在各设定的荧光 RT-PCR 管中分别加入制备好的 RNA 溶液 10 μ L,盖紧管盖,500 r/min 离心 30 s。转移至检测区。
- 6.3.4.4 荧光 RT-PCR 检测:在检测区进行。将 6.3.4.3 中离心后的 PCR 管放入荧光 RT-PCR 检测仪内,在 96 孔板内(表内)记录或填写被检样品(Unknown)、阳性对照(PC)、阴性对照(NTC);设置探针:5'为 FAM,3'为 TAMAR。
- 6.3.4.5 循环条件设置:第一阶段,反转录 42 $^{\circ}$ C,30 min;第二阶段,预变性 94 $^{\circ}$ C,3 min;第三阶段,94 $^{\circ}$ C/20 s,60 $^{\circ}$ C/30 s,40 个循环。试验检测结束后,保存结果,根据收集的荧光曲线和 Ct 值判定结果。

6.4 结果判定

6.4.1 结果分析和条件设定

直接读取检测结果。基线和阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整,以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增曲线的最高点为准。

6.4.2 质控标准

- 6.4.2.1 阴性对照无 Ct 值,并且无扩增曲线,一直为水平线。
- 6.4.2.2 阳性对照的 Ct 值应小于 28.0,并出现典型的扩增曲线,两个阳性对照扩增曲线基本重合。否则,此次实验视为无效。

6.4.3 结果描述及判定

6.4.3.1 阴性

无 Ct 值并且无扩增曲线,表示样品中无水泡性口炎病毒。

6.4.3.2 阳性

Ct 值小于等于 30.0,且出现典型的扩增曲线,表示样品中存在水泡性口炎病毒。

6.4.3.3 有效原则

Ct 值在 30.0~35 的样本建议重做。重做结果无 Ct 值或者大于等于 30.0 为阴性,否则为阳性。

6.4.4 结果处理

如样品经荧光 RT-PCR 反应判定为阳性,应立即将原样品按生物安全要求包装送国家口蹄疫参考实验室确认。

7 微量血清中和试验

7.1 试剂和材料

- 7.1.1 病毒:VSV-NJ 和 VSV-IND 国际标准毒株。

7.1.2 血清:VSV-NJ 和 VSV-IND 两型标准阳性血清、阴性血清。

7.1.3 被检血清。

7.1.4 细胞:BHK-21 或 Vero 细胞株。

7.1.5 细胞培养液:E-MEM 细胞生长液,配制见附录 A。

7.1.6 细胞维持液:E-MEM 细胞维持液,配制见附录 A。

7.1.7 细胞分散液:配制见附录 A。

7.2 器械和设备

分析天平、高压灭菌器、干烤箱、超声波粉碎机、倒置显微镜、微型振荡器、二氧化碳培养箱、冰箱(−20℃保存血清,−70℃保存种毒)。96孔组织培养板,单孔道、多孔道微量移液器(20 μL~200 μL)。

7.3 试验程序

7.3.1 病毒繁殖

制备 BHK-21 或 Vero 细胞单层,加维持液洗去细胞培养液中的犊牛血清后,弃维持液,然后接种 VSV-NJ 型和 VSV-IND 病毒,37℃吸附 1 h,弃去细胞瓶中接种的病毒液,加入维持液,置 5%二氧化碳培养箱 37℃培养,逐日观察,出现细胞圆缩、脱落等 CPE。待 CPE 达 75%以上,收获病毒悬液,冻融或超声波处理,2 000 r/min 离心 20 min,分装成每小瓶 1 mL,置−70℃保存备用。

7.3.2 毒价测定

将各型病毒在 96 孔板上作 $10^0 \sim 10^{-10}$ 稀释,每孔病毒悬液为 50 μL,每个稀释度作 8 孔,加入 100 μL 细胞悬液(浓度 3×10^5 细胞/mL),每孔再加入 50 μL E-MEM,每块板设 8 孔细胞对照。置 5%二氧化碳培养箱 37℃培养,从 24 h 开始逐日观察记录 CPE。按 Karber 方法计算出各型病毒的 $TCID_{50}/50 \mu L$ 。

7.3.3 操作步骤

7.3.3.1 血清处理

水泡性口炎标准阳性血清、阴性血清、被检血清经 56℃ 30 min 灭能。

7.3.3.2 设立对照

7.3.3.2.1 细胞对照:设 4 孔正常细胞对照,即每孔加细胞悬液 100 μL(3×10^5 个细胞/mL)、稀释液 100 μL。

7.3.3.2.2 阴性血清对照:设 4 孔阴性对照,每孔加阴性血清和 100 $TCID_{50}/50 \mu L$ 病毒悬液各 50 μL,再加入细胞悬液 100 μL(3×10^5 个细胞/mL)。

7.3.3.2.3 病毒回归对照:将各型病毒稀释成 1 000、100、10、1 $TCID_{50}/50 \mu L$,每个稀释度作 4 孔,每孔加入 50 μL 病毒悬液,再加入细胞悬液 100 μL(3×10^5 个细胞/mL)、每孔补充稀释液 50 μL。

7.3.3.2.4 阳性血清对照:将阳性血清分别作 1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128 稀释,每个稀释度作 4 孔,每孔加各稀释度阳性血清和 100 $TCID_{50}/50 \mu L$ 病毒悬液各 50 μL,再加入细胞悬液 100 μL(3×10^5 个细胞/mL)。

7.3.3.2.5 血清毒性对照:每份被检血清应按稀释度各设一孔毒性对照、每孔各加稀释度血清 50 μL,稀释液 50 μL 和 100 μL 细胞悬液。

7.3.3.3 中和试验

7.3.3.3.1 实验步骤

将每份被检血清作 1 : 4、1 : 8、1 : 16、1 : 32、1 : 64、1 : 128 稀释,每个稀释度作 4 个孔,每孔各加稀释度血清 50 μ L。每孔加入病毒悬液 50 μ L(100 TCID₅₀/50 μ L),振荡 3 min~5 min,置 37 $^{\circ}$ C 中和 1 h;加细胞悬液 100 μ L(3×10^5 个细胞/mL),置 37 $^{\circ}$ C 5%二氧化碳培养箱培养,24 h 后逐日观察 CPE 并进行记录,培养 7 d。

7.3.3.3.2 结果判定

当病毒回归 1 000、100、10 TCID₅₀/50 μ L 全部出现 CPE、1 TCID₅₀/50 μ L 出现 50% CPE,阳性血清 1 : 32 出现 50% 以上保护、阴性孔细胞 100% 病变、正常细胞孔细胞形态正常、血清毒性对照孔无细胞毒性出现,全部对照成立时,才能进行判定,判定时间为 48 h~72 h。被检血清孔 50% 出现保护,判为阳性,如低于 50% 判为阴性。当某份血清的某一稀释度出现 50% 保护时,该血清稀释度即为该份血清的中和抗体滴度。

8 酶联免疫吸附试验

8.1 试剂和材料

- 8.1.1 包被抗原:水泡性口炎病毒提纯抗原。
- 8.1.2 血清:水泡性口炎标准阳性、阴性血清。
- 8.1.3 被检血清:经 56 $^{\circ}$ C 30 min 灭能。
- 8.1.4 水泡性口炎病毒特异性单克隆抗体(VSV-McAb)。
- 8.1.5 羊抗鼠 IgG-HRP:可从有关生物试剂公司购买,按说明书指定的工作浓度稀释使用。
- 8.1.6 包被液、洗涤液、封闭液、稀释液、底物液、终止液:配制见附录 A。

8.2 器械和设备

- 8.2.1 酶标仪。
- 8.2.2 可拆 96 孔酶标板。
- 8.2.3 单孔道、多孔道可调微量移液器(1 μ L、50 μ L、100 μ L、1 000 μ L)、微量滴头。
- 8.2.4 吸管(5 mL、10 mL)。
- 8.2.5 刻度量筒(100 mL、1 000 mL)。
- 8.2.6 试剂瓶(50 mL、100 mL、500 mL)。
- 8.2.7 洗涤瓶(500 mL)。
- 8.2.8 贮液器。
- 8.2.9 计算器。
- 8.2.10 37 $^{\circ}$ C 恒温箱。

8.3 试验操作

- 8.3.1 包被酶标板:按照提供的包被抗原所附说明书要求,用包被液稀释抗原,包被 96 孔酶标板,每孔 50 μ L,置 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。
- 8.3.2 用稀释液按 1 : 10 稀释阳性、阴性对照血清和所有被检血清,被检血清稀释可在试验前 1 d 进

行,置 4℃过夜。

8.3.3 洗涤:取出已包被抗原的酶标板,用洗涤液洗板三次,在纸巾上拍干。

8.3.4 加样如下:

- a) 按表 2 所示设立稀释液空白对照、阴性血清对照、阳性血清对照;
- b) 每份被检血清样品加两孔;
- c) 取 100 μL 稀释液入空白对照孔,取 50 μL 阴性、阳性血清加入相应的对照孔,取 50 μL 被检血清样品入相邻横行孔内,37℃湿盒感作 1 h,用洗涤液洗板三次。

表 2 水泡性口炎竞争酶联免疫吸附试验

1	1	9	9	BL	BL	19	19	27	27	35	35
2	2	10	10	BL	BL	20	20	28	28	36	36
3	3	11	11	PC	PC	21	21	29	29	37	37
4	4	12	12	PC	PC	22	22	30	30	38	38
5	5	13	13	NC	NC	23	23	31	31	39	39
6	6	14	14	NC	NC	24	24	32	32	40	40
7	7	15	15	17	17	25	25	33	33	41	41
8	8	16	16	18	18	26	26	34	34	42	42

注: BL—空白对照,PC—阳性血清对照,NC—阴性对照。1~42 为样品号。

8.3.5 McAb 和羊抗鼠 IgG-HRP 的稀释:McAb 按说明书要求,用稀释液稀释,混匀;羊抗鼠 IgG-HRP 按说明书要求,用稀释液稀释,混匀。

8.3.6 加 McAb:每孔加 50 μL McAb(空白对照不加),轻轻混匀。酶标板置 37℃湿盒感作 30 min。

8.3.7 加酶结合物:除空白对照孔外,其他所有孔每孔加 50 μL 羊抗鼠 IgG-HRP。轻轻混匀。酶标板置 37℃湿盒中感作 30 min。

8.3.8 配制底物液:取出 9.7 mL 底物液于棕色瓶中,加入 TMB 液 300 μL 和 7 μL 30% H₂O₂,充分混匀。

8.3.9 洗涤酶标板孔 5 次。

8.3.10 加底物液:在室温下所有板孔加 100 μL 底物液(此步要尽快完成),酶标板置湿盒暗盒 10 min。

8.3.11 加终止液:快速加入 50 μL/孔终止液。终止后,应在 30 min 内测定 OD 值,以免颜色发生变化。

8.3.12 用酶标仪在波长 450 nm 下测定 OD 值,按下式计算 PI。

8.3.13 抑制百分比(PI)计算见式(1):

$$PI = \left(100 - \frac{\text{被检血清平均 OD 值}}{\text{阴性血清平均 OD 值}} \times 100\right) \times 100\% \quad \cdots \cdots (1)$$

8.3.14 结果判定:PI≥50%被检血清 VSV 抗体阳性;PI<50%被检血清 VSV 抗体阴性;PI 在 45%~50%之间的样品判为可疑,应重复试验,如 PI 仍在 45%~50%之间,则判为阳性。

附 录 A
(规范性附录)
溶 液 配 方

A.1 碳酸缓冲甘油

A.1.1 0.5 mol/L pH9.5 碳酸缓冲液的配制

无水碳酸氢钠(NaHCO_3)	3.70 g
无水碳酸钠(Na_2CO_3)	0.60 g
蒸馏水	100 mL
抽滤除菌。	

A.1.2 碳酸缓冲甘油

1 份碳酸缓冲液加 9 份灭菌甘油混合即成。

A.2 0.01 mol/L pH7.2~7.4 磷酸盐缓冲液(PBS)

无水磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	1.19 g
无水磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)	0.22 g
氯化钠(NaCl)	8.50 g
蒸馏水	1 000 mL
1.034×10^5 Pa,15 min 高压灭菌或抽滤除菌。	

A.3 乳糖蛋白胨缓冲液肉汤(BLP)

A.3.1 a 液的配制：

无水磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)	4.60 g
三蒸水	500 mL

A.3.2 b 液的配制：

无水磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	9.40 g
三蒸水	1 000 mL

A.3.3 工作液：

a 液	220 mL
b 液	780 mL
蛋白胨	2.00 g
乳糖	100 g

1.034×10^5 Pa,15 min 高压灭菌或抽滤除菌。

A.4 变性液的配制

柠檬酸钠	0.764 g
------	---------

十二烷基肌氨酸钠	0.5 g
β-巯基乙醇	0.868 mL
异硫氰酸胍	7.418 g
灭菌三蒸水	水加至 100 mL

A.5 裂解液

裂解液的主要成分为异硫氰酸胍和酚,为 RNA 提取试剂,外观为红色液体,于 4 ℃ 保存;可直接购买商品化的 Trizol 试剂。

A.6 5 倍 AMV 逆转录酶浓缩缓冲液

Tris-HCl	250 mmol/L,pH8.3
氯化钾(KCl)	250 mmol/L
氯化镁(MgCl ₂)	50 mmol/L
DTT	50 mmol/L

A.7 Taq 酶用 10 倍浓缩缓冲液

Tris-HCl	500 mmol/L,pH8.8
氯化钾(KCl)	500 mmol/L
Triton X-100	1%

A.8 上样缓冲液

每 100 mL 水溶液中含:溴酚蓝 0.25 g,蔗糖 40 g。

A.9 DEPC 处理水

去离子水中按 0.1% 加入 DEPC(焦碳酸二乙酯),室温或 37 ℃ 静置过夜,1.034×10⁵ Pa 高压 30 min,冷却备用。

A.10 5× Tris-硼酸(TBE)电泳缓冲液

Tris	54.0 g
硼酸	27.5 g
0.5 mol/L EDTA(pH8.0)	20 mL
三蒸水定容至	1 000 mL
充分溶解,4 ℃ 保存。	

A.11 10 mg/mL 溴化乙锭溶液

溴化乙锭	1 g
------	-----

三蒸水100 mL
置棕色瓶中,磁力搅拌数小时以确保其完全溶解,然后用铝箔包裹容器,保存于室温。
本品为强致癌物,使用时需小心。

A. 12 2%琼脂糖凝胶的制备

在 200 mL 三角烧瓶中加入:电泳级琼脂糖,2 g;0.5×TBE 缓冲液,100 mL。微波炉中使之完全溶解后,加入 10 mg/mL 溴化乙锭溶液 5 μL 充分摇匀,备用;待琼脂糖冷却到 60 ℃左右,倒入制胶板并防止气泡产生,使琼脂糖厚度达 3 mm~5 mm;待凝胶完全凝固后去掉梳子和两端封口物,将凝胶托盘放入电泳槽,加入 0.5×TBE 电泳缓冲液使之高出凝胶 2 mm~3 mm。

A. 13 无钙镁离子的 0.01 mol/L PBS(pH7.2)

磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄)	1.19 g
磷酸二氢钠(NaH ₂ PO ₄)	0.22 g
氯化钠(NaCl)	8.50 g
水	1 000 mL

A. 14 0.04 mol/L pH7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)

磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄)	0.56 g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	0.14 g
氯化钠(NaCl)	8.5 g
水	加至 1 000 mL

A. 15 E-MEM 细胞生长液

按说明书要求配制 E-MEM 培养基,加 10%无水泡性口炎抗体的胎牛血清(经 56 ℃ 30 min 灭活),含青霉素 200 IU/mL、链霉素 200 μg/mL)。抽滤除菌,同时分装,贮存于 4 ℃冰箱。

A. 16 E-MEM 细胞维持液

按说明书要求配制 E-MEM 培养基,加 2%无水泡性口炎抗体的胎牛血清经 56 ℃ 30 min 灭活,含青霉素 200 IU/mL、链霉素 200 μg/mL)。抽滤除菌,同时分装,贮存于 4 ℃冰箱。

A. 17 细胞分散液

胰酶	2.5 g
乙二胺四乙酸二钠(EDTA)	0.2 g
无钙镁 PBS	1 000 mL
抽滤除菌,同时分装,冻存。	

A. 18 包被液:0.05 mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液

碳酸氢钠(NaHCO ₃)	1.46 g
碳酸钠(Na ₂ CO ₃)	0.97 g(或 Na ₂ CO ₃ • 10H ₂ O 1.2 g)
水	500 mL
溶解后置于 4 ℃ 冰箱,一周内使用。	

A. 19 洗涤液(0.01 mol/L pH7.4 PBS 0.05%吐温-20,PBST)

氯化钠(NaCl)	4 g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	0.1 g
磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄ • 12H ₂ O)	1.45 g
氯化钾(KCl)	0.1 g
吐温-20	0.25 mL
水	500 mL
溶解后置于 4 ℃ 冰箱备用。	

A. 20 稀释液:1%明胶或 5%鸡血清 PBST

洗涤液	100 mL
明胶	1 g
或	
洗涤液	95 mL
鸡血清	5 mL
溶解或混匀后置于 4 ℃ 冰箱备用。	

A. 21 底物液

A. 21.1 乙酸-柠檬酸缓冲液(pH6.0)

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。	
配制:取 B 液约 2 mL 至 A 液中调 pH 值至 6.0,置于 4 ℃ 冰箱备用。	

A. 21.2 TMB 溶液

TMB	350 mg
-----	--------

甲醇	100 mL
加温溶解后于暗盒中存室温。	

A.21.3 工作底物液(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

A.22 终止液:1 mol/L H₂SO₄

浓硫酸	22.2 mL
水	177.8 mL

A.23 封闭液

3%明胶或 10%灭能鸡血清 PBST。

附 录 B
(资料性附录)

RT-PCR 扩增片段序列(227 bp/119 bp)

1 ggaacaaaa agatgggtcac gagtgcacatg tggtacaaat gatcaaattc cgacatgtgc
61 taatttgatg tcttcagtct ctactaatgc attaacgggt gcacactttg cagaaagccc
121 tataaacgca atgattcaat ataattattt tgggac cttt gctcgattat tgctctttat
181 gcatgacct gcaataagac aatctctgta tacagtcaag gaaaa gatac ctggtttgca
241 caccagaaca ttcaaatagc ctgtattata tctagatcct tcaatcggag gggaatgtgg
301 tatggcggtg tctcgattct taatcagagc tttt ccagat ccggaaacag agagcctt tc
361 attctggaaa tttatttatg aacatgctcg gagcctccat cttaaaaaga tggctgtaat
421 gtttggggac cttccaattg ccaaattcag aatagagcat atcaataagt tattagagga
