

ICS 11.220  
B 41



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 27536—2011

GB/T 27536—2011

## 猪流感病毒分离与鉴定方法

Isolation and identification of swine influenza virus

中华人民共和国  
国家标准  
猪流感病毒分离与鉴定方法  
GB/T 27536—2011

\*

中国标准出版社出版发行  
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100013)  
北京市西城区三里河北街16号(100045)  
网址 www.spc.net.cn  
总编室:(010)64275323 发行中心:(010)51780235  
读者服务部:(010)68523946  
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷  
各地新华书店经销

\*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 13 千字  
2012年2月第一版 2012年2月第一次印刷

\*

书号: 155066·1-44048 定价 16.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换  
版权专有 侵权必究  
举报电话:(010)68510107



GB/T 27536-2011

2011-11-21 发布

2012-03-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局  
中国国家标准化管理委员会 发布

**附录 B**  
(规范性附录)  
**生物安全注意事项**

- B.1** 所有的操作过程应在生物安全二级(biology security level 2:能够安全操作,对实验室工作人员和动物致病性低的,对环境有轻微危害的病原微生物的生物安全水平)实验室中进行。
- B.2** 亚型鉴定要求有全套的流感病毒血凝素(HA)分型血清和神经氨酸酶(NA)分型血清。
- 

**前 言**

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。  
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:乔传玲、杨焕良、陈艳、辛晓光、陈化兰。

附录 A  
(资料性附录)  
相关试剂的配制

#### A.1 0.01 mol/L pH7.0~7.4 PBS

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.42 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.27 g
灭菌双蒸水	800 mL

NaOH 或者 HCl 调 pH7.0~7.4, 灭菌双蒸水加至 1 000 mL 定容, 121 °C 高压灭菌 15 min 或过滤除菌。

#### A.2 0.85%生理盐水

NaCl 8.5 g, 加灭菌双蒸水 1 000 mL 定容, 121 °C 高压灭菌 15 min 或过滤除菌。

#### A.3 阿氏(Alsevers)液

葡萄糖	2.05 g
柠檬酸钠	0.8 g
柠檬酸	0.055 g
氯化钠	0.42 g
灭菌双蒸水	至 100 mL
NaOH 或者 HCl	调 pH6.1

121 °C 高压灭菌 15 min, 2 °C~8 °C 保存备用。

#### A.4 0.5%红细胞悬液

采集 SPF 公鸡或无禽流感和新城疫等抗体的健康公鸡的血液与等体积阿氏液混合, 用 PBS 液洗涤 3 次, 以 3 000 r/min 离心 5 min, 洗涤后用 PBS 配成 0.5% (体积分数) 红细胞悬液, 2 °C~8 °C 保存备用。

#### A.5 PBS, pH5.9

A 溶液[0.4 mol/L 磷酸二氢钠(NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)]: 称取 27.6 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 溶于 500 mL 去离子水中。

B 溶液[0.4 mol/L 磷酸氢二钠(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)]: 称取 28.4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 溶于 500 mL 去离子水中。

取 81 mL 溶液 A, 19 mL 溶液 B 混匀配成 0.4 mol/L PBS, pH5.9。如果需要, 用适当的溶液 A 或 B 调 pH 值。室温保存。

## 猪流感病毒分离与鉴定方法

### 1 范围

本标准规定了猪流感病毒分离与鉴定方法。

本标准适用于各种亚型猪流感的病原分离和鉴定。

### 2 试验材料、试剂

- 2.1 剪刀、镊子。
- 2.2 1 mL 注射器。
- 2.3 单道及多道微量移液器、吸头。
- 2.4 9~11 日龄 SPF 鸡胚。
- 2.5 犬肾细胞(MDCK)。
- 2.6 6 孔培养板。
- 2.7 DMEM 培养基。
- 2.8 HEPES 缓冲液(1 mol/L 储存液)。
- 2.9 胎牛血清。
- 2.10 TPCK-胰蛋白酶(胰蛋白酶经 TPCK 处理)。
- 2.11 0.01 mol/L pH7.0~7.4 磷酸盐缓冲液(PBS)(参见附录 A 中 A.1)。
- 2.12 磷酸盐缓冲液(pH5.9)(参见附录 A 中 A.5)。
- 2.13 0.85%生理盐水(参见附录 A 中 A.2)。
- 2.14 阿氏(Alsevers)液(参见附录 A 中 A.3)。
- 2.15 0.5%红细胞悬液(参见附录 A 中 A.4)。
- 2.16 胎球蛋白(参见附录 A 中 A.6)。
- 2.17 过碘酸盐(参见附录 A 中 A.7)。
- 2.18 亚砷酸盐(参见附录 A 中 A.8)。
- 2.19 硫代巴比妥酸(参见附录 A 中 A.9)。
- 2.20 无菌蒸馏水或去离子水。

### 3 仪器

- 3.1 生物安全柜(柜内负压, 有 HEPA 过滤器可避免细胞培养物污染及保护操作人员安全)。
- 3.2 孵化器。
- 3.3 CO<sub>2</sub> 培养箱。
- 3.4 台式高速冷冻离心机。
- 3.5 37 °C 水浴加热器。
- 3.6 煮沸锅。
- 3.7 棉拭子(医用棉签)。
- 3.8 研磨器。