

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1187—2006

鸡传染性贫血病毒聚合酶链反应试验方法

Polymerase chain reaction for chicken infectious anemia virus



061030090143

2006-07-10 发布

2006-10-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

鸡传染性贫血(Chicken Infectious Anemia)是由鸡传染性贫血病毒(Chicken Infectious Anemia Virus)引起的一种传染病,主要损害鸡的造血和淋巴器官,引起雏鸡再生障碍性贫血和全身淋巴组织萎缩,导致免疫功能抑制,已成为危害养鸡业的重要疫病之一。

本标准附录 A 为规范性附录。

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归口。

本标准主要起草人:田克恭、王宏伟、孙明、王传彬、陈西钊。

鸡传染性贫血病毒聚合酶链反应试验方法

1 范围

本标准规定了鸡传染性贫血病毒(CAV)聚合酶链反应(PCR)的技术要求。

本标准适用于鸡血清和组织中的鸡传染性贫血病毒检测。

2 试剂

2.1 消化液(见附录 A.1)

2.2 2%蛋白酶 K 溶液

2.3 酚/氯仿/异戊醇混合液(见附录 A.2)

2.4 2.5 mmol/L dNTP

2.5 8 mmol/L 上下游引物混合液(引物序列见附录 A.3)

2.6 0.5 U/ μ L TaqDNA 聚合酶

2.7 10 \times PCR 缓冲液

2.8 1%溴化乙锭(EB)溶液

2.9 TAE 电泳缓冲液

2.10 1%琼脂糖凝胶

2.11 上样缓冲液(见附录 A.4)

2.12 其他试剂:异丙醇(分析纯)、100 bp Marker、75%乙醇溶液、15 mmol/L 氯化镁溶液、灭菌双蒸水。

3 实验室条件

3.1 实验室必须为生物安全 II 级(BSL-2 级)以上实验室。

3.2 实验室分区:PCR 试验区域分 PCR 反应液配制区—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。严禁器材和试剂倒流。

3.3 实验室应配备的仪器及耗材

3.3.1 仪器:分析天平、高速离心机、真空干燥器、PCR 扩增仪、电泳仪、电泳槽、紫外凝胶成像仪(或紫外分析仪)、液氮罐或 -70 $^{\circ}$ C 冰箱、微波炉、组织研磨器、-20 $^{\circ}$ C 冰箱、水浴锅、可调移液器(最大量程为 2 μ L、20 μ L、200 μ L、1 000 μ L)。

3.3.2 耗材:眼科剪、眼科镊、称量纸、10 mL 一次性注射器、1.5 mL 灭菌离心管、0.2 mL 薄壁 PCR 管、琼脂糖、500 mL 量筒、500 mL 锥形瓶、吸头(10 μ L、200 μ L、1 000 μ L)、灭菌双蒸水。

4 操作程序

4.1 样品的采集与处理

4.1.1 样品的采集:濒死鸡、扑杀鸡取肝脏;待检活鸡,用注射器取血 2 mL~4 mL,立即送往实验室。

4.1.2 样品的处理:每份样品分别处理。

4.1.2.1 组织样品处理:取待检病料约 0.2 g 置研磨器中剪碎并研磨,加入 2 mL 消化液继续研磨。取已研磨好的待检病料上清 200 μ L,置 1.5 mL 灭菌离心管中,再加入 400 μ L 消化液和 10 μ L 蛋白酶 K 溶