

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 574—2023

代替 NY/T 574—2002

地方流行性牛白血病诊断技术

Diagnostic techniques for enzootic bovine leukosis

2023-12-22 发布

中华人民共和国农业农村部 发布



前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替 NY/T 574—2002《地方流行性牛白血病琼脂凝胶免疫扩散试验方法》，与 NY/T 574—2002 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 更改了本文件的适用范围(见第 1 章,2002 年版的第 1 章)；
- b) 增加了术语与定义(见第 3 章)；
- c) 增加了缩略语(见第 4 章)；
- d) 增加了临床诊断(见第 5 章)；
- e) 增加了样品采集、保存与运输(见第 6 章)；
- f) 增加了病原分离(见第 7 章)；
- g) 增加了巢式 PCR(见第 8 章)；
- h) 增加了实时荧光 PCR(见第 9 章)；
- i) 增加了阻断 ELISA(见第 10 章)；
- j) 增加了琼脂凝胶免疫扩散中试剂耗材、仪器设备、加样、孵育、实验成立条件(见 11.1、11.2、11.3.3、11.3.4、11.3.5)；
- k) 更改了琼脂凝胶免疫扩散中琼脂平板制备(见 11.3.1,2002 年版的 2.2.1)、打孔(见 11.3.2,2002 年版的 2.2.2)、结果判定(见 11.3.6,2002 年版的 2.3)；
- l) 增加了综合判定(见第 12 章)。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本文件起草单位：中国动物疫病预防控制中心、青海省动物疫病预防控制中心、北京亿森宝生物科技有限公司、重庆市动物疫病预防控制中心、上海市动物疫病预防控制中心、四川省动物疫病预防控制中心、陕西省动物疫病预防控制中心、陕西省动物卫生与屠宰管理站。

本文件主要起草人：孙雨、王传彬、顾小雪、翟新验、杨林、刘颖昞、徐琦、毕一鸣、蔡金山、阚威、王新杰、孙晓明、高姗姗、白雪冬、曾政、董春霞、骆璐、赵洪进、王建、杨显超、陈斌、陈弟诗、赵光明、朱宝、齐亚辉、孙航、胡冬梅、冯冰。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2002 年首次发布为 NY/T 574—2002《地方流行性牛白血病琼脂凝胶免疫扩散试验方法》；

——本次为第一次修订。



地方流行性牛白血病诊断技术

1 范围

本文件规定了牛白血病的临床诊断、样品采集与处理、病原学和血清学方法的技术要求。
本文件适用于牛白血病的诊断、检测、检疫、监测和流行病学调查。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;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

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

地方流行性牛白血病 **enzootic bovine leukosis**

一种以淋巴样细胞恶性增生,进行性恶病质变化和全身淋巴结肿大特征的一种慢性、进行性、接触传染性肿瘤病。由反转录病毒科肿瘤病毒亚科中的牛白血病病毒(Bovine leukaemia virus, BLV)引起。

3.2

聚合酶链式反应 **polymerase chain reaction**

利用一段 DNA 为模板,在 DNA 聚合酶和核苷酸底物共同参与下,将该段 DNA 扩增至足够数量,以便进行结构和功能分析。

3.3

实时荧光 PCR **real-time PCR**

一种利用荧光信号、累积实时监测整个 PCR 进程的试验方法。

3.4

Ct 值 **cycle threshold**

每个实时荧光 PCR 反应管内的荧光信号量达到设定的阈值所经历的循环次数。

3.5

琼脂凝胶免疫扩散 **agar gel immunodiffusion**

琼扩试验

在琼脂凝胶中进行的抗原抗体免疫沉淀反应,可用于血清学定型。

3.6

酶联免疫吸附试验 **enzyme-linked immunosorbent assay**

由酶分子与抗体分子共价结合形成酶标记抗体。此种结合不会改变抗体的免疫学特性,也不影响酶的生物活性。通过此种酶标记抗体与吸附在固相载体上的抗原发生特异性结合,当加入底物溶液后,底物可在酶作用下出现显色反应。此种显色反应可通过酶标仪进行定量测定,从而通过底物的显色反应来判定有无相应的免疫反应。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

AGID:琼脂凝胶免疫扩散(agar gel immunodiffusion)
DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)
EBL:地方流行性牛白血病(enzootic bovine leukosis)
ELISA:酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay)
FBL:胎牛肺细胞(fetal bovine lung)
MEM:最低必需培养基(minimum essential medium)
OD:光密度(optical density)
PCR:聚合酶链式反应(polymerase chain reaction)
PBS:磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline)
PBMC:外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell)

5 临床诊断

5.1 易感动物

各年龄段牛(包括牦牛、水牛以及野生牛类)均易感,肿瘤(淋巴肉瘤)常见于3岁以上的牛。

5.2 传播途径

牛的各种体液(鼻和支气管液、唾液、血液、精液、牛奶)中均存在BLV,可通过血源性传播、分泌物传播、乳源性传播、寄生虫传播、精液和胚胎移植传播等多种途径传播,也可通过被血液污染的直肠检查用针头、手术设备、手套以及吸血昆虫等机械性传播。

5.3 临床症状

5.3.1 地方流行型

潜伏期一般为4年~5年,多发生于3岁以上成年牛,4岁~8岁牛感染率最高。最急性病例无前驱症状即死亡。亚急性病例病程多为7d至数月,表现为食欲减退、贫血和肌无力。当肿瘤广泛生长时,体温可升高至39.5℃~40℃,病牛表现为生长缓慢,全身体表淋巴结显著肿大而且坚硬,依部位不同可导致病牛头偏向一侧,眼球突出,严重时被挤出眼眶,有的出现贫血,心脏受损,消化功能紊乱,流产、难产或不孕,共济失调、麻痹等症状。

5.3.2 散发型

犊牛多见于4月龄以下,主要表现为淋巴结对称性肿大。青年牛多见于18月龄~20月龄,出现全身淋巴结肿大,内脏特别是胸腺出现肿瘤,并伴有贫血和下痢,心和肝脏的肿瘤可导致病牛死亡。

5.4 病理变化

剖检可见,淋巴结和某些器官肿瘤病变,瘤块外观肿大、灰红色、坚实、有弹性。肿瘤的发生分布每例不一,成年牛多发体表淋巴结,膈肌、肠系膜、真胃、肌肉、心肌多有肿瘤病变。肿瘤的病理组织学表现为有致密的基质及淋巴细胞和成淋巴细胞的大量增殖,患病组织有大量瘤细胞浸润、破坏并代替正常的组织细胞。

5.5 结果判定

易感动物符合5.3、5.4的规定,可初步判定为疑似病例。确诊应采集易感动物的血液或组织进行病原学或血清学检测。

6 样品采集、保存与运输

6.1 总则

宜选择EBL发病期、具有典型临床症状的牛,进行样品采集。在采样过程中,应避免交叉污染。样品采集、保存及运输应符合GB 19489的规定。

6.2 样品采集

6.2.1 抗凝血样品采集

采集牛静脉抗凝血5 mL,来回颠倒几次,使抗凝剂与血液充分混合。使用商品化核酸提取试剂,提取

抗凝血中的 PBMC。

6.2.2 组织器官样品采集

无菌采集典型肿瘤病变组织 0.5 g~1.0 g,置于无菌采样袋或其他灭菌容器中,密封保存。

6.2.3 血清样品采集

无菌采集牛静脉血 5 mL,分离血清。将血清置于 2 mL 无菌离心管中,加盖密封保存。

6.3 样品保存和运输

样品采集后,应尽快置于保温箱中,加入预冷的冰袋,密封,宜 24 h 内送实验室检测。待检样品应尽快处理,在 4 °C 存放应不超过 4 d。样品在低温条件下保存时间稍长;样品若长期保存,应以 -70 °C 以下条件为宜。

6.4 样品处理

6.4.1 抗凝血样品处理

使用商品化 PBMC 细胞提取试剂,提取抗凝血中的 PBMC。

6.4.2 组织器官样品处理

加入 0.5 mL~1 mL 0.01 mol/L 的 PBS(pH 7.2),于组织匀浆器或研钵中充分匀浆或研磨,将组织悬液转入无菌离心管中备用。

6.4.3 血清样品处理

血清样品以 6 000 r/min 离心 5 min,取上清液待检。

7 病原分离

7.1 基本要求

除特殊说明外,本文件所有操作程序均应符合 GB 19489 的规定。

7.2 试剂耗材

7.2.1 除特殊说明外,本文件使用的化学试剂均为分析纯,水均为符合 GB/T 6682 规定的二级水。

7.2.2 商品化 Ficoll Pague PLUS 提取试剂。

7.2.3 商品化 MEM 培养基。

7.3 病原分离与鉴定

采用 PBMC 和指示细胞共培养,通过刺激有丝分裂原产生感染性的病毒。将 1.5 mL 外周血置于乙二胺四乙酸中,用聚蔗糖/甲基泛影酸钠密度梯度法离心分离 PBMC 或用商品化 Ficoll Pague PLUS 提取试剂盒提取 PBMC。用 2×10^6 个的 FBL 细胞培养 PBMC,置于 40 mL 含 20% 胎牛血清的 MEM 中,生长 3 d~4 d。病毒在 FBL 细胞的单层细胞中发育,导致合胞体的形成。制备短期培养物,可将 PBMC 置于无 FBL 的培养基中,于 24 孔板中培养 3 d。取培养物的上清液,采用 PCR 方法和实时荧光 PCR 方法检测 BLV 前病毒。

8 巢式 PCR

8.1 试剂耗材

8.1.1 商品化 DNA 提取试剂盒。

8.1.2 商品化 $10 \times$ PCR 缓冲液。

8.1.3 DL2 000 marker。

8.1.4 $50 \times$ TAE 缓冲液,配制方法按照附录 A 中 A.1 的规定执行。

8.1.5 2% 琼脂糖凝胶,配制方法按照 A.3 的规定执行。

8.1.6 商品化无 RNA 酶水。

8.1.7 $6 \times$ 上样缓冲液。

8.1.8 微量可调移液器(10 μ L~100 μ L,20 μ L~200 μ L,100 μ L~1 000 μ L)以及相应滤芯吸头。

8.1.9 0.2 mL PCR 管。

8.2 仪器设备

8.2.1 PCR 扩增仪。

8.2.2 台式离心机。

8.2.3 电泳仪。

8.2.4 普通冰箱(−20 ℃)。

8.2.5 II 级生物安全柜。

8.3 引物序列

鉴定 *env* 基因的引物序列及其 PCR 产物长度见表 1,特异性扩增片段序列见附录 B。

表 1 鉴定 *env* 基因的引物序列及其 PCR 产物长度

引物名称	序列	长度, bp	扩增片段大小, bp
BLV-env-1	TCTGTGCCAAGTCTCCCAGATA	22	598
BLV-env-2	AACAACAACCTCTGGGAAGGG	21	
BLV-env-3	CCCACAAGGGCGGCGCCGTTT	22	444
BLV-env-4	GCGAGCCGGTCCAGAGCTGG	22	

8.4 对照样品

阳性对照:含有目的基因片段的质粒或者病毒分离培养物。

阴性对照:无 RNA 酶水。

8.5 实验步骤

8.5.1 DNA 提取

按商品化 DNA 提取试剂盒的操作说明书,分别提取待检样品、阳性对照、阴性对照 DNA,置于 −20 ℃ 冰箱中备用。

8.5.2 巢式 PCR 反应

巢式 PCR 反应第一轮扩增体系见表 2。

表 2 第一轮 PCR 扩增体系

组成	体积, μL
10× PCR 缓冲液	5
引物 BLV-env-1(20 pmol/μL)	1.25
引物 BLV-env-2(20 pmol/μL)	1.25
dNTP(每个 25 mol/L)	0.15
MgCl ₂ (25 mol/L)	3
<i>Taq</i> 聚合酶(1.25 U)	0.25
蒸馏水	19.1
模板(约 1 μg DNA)	20
总计	50

巢式 PCR 反应第二轮扩增体系见表 3。

表 3 第二轮 PCR 扩增体系

组成	体积, μL
10× PCR buffer	5
引物 BLV-env-3(20 pmol/μL)	1.25
引物 BLV-env-4(20 pmol/μL)	1.25
dNTP(每个 25 mol/L)	0.15
MgCl ₂ (25 mol/L)	3
<i>Taq</i> 聚合酶(1.25 U)	0.25
蒸馏水	36.1
模板(第一轮 PCR 产物)	3
总计	50

第一轮 PCR 按如下条件进行 PCR 反应:94 °C 预变性 2 min;95 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 60 s,30 个循环;72 °C 终延伸 4 min。扩增后产物加入第二轮 PCR 反应体系内,按如下条件进行 PCR 反应:94 °C 预变性 2 min;95 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 60 s,30 个循环;72 °C 终延伸 4 min。

8.5.3 电泳

将 10 μL 巢式 PCR 产物和 2 μL 的上样缓冲液(6 \times)混合,点于 2% 的凝胶上(含有核酸染料)进行电泳,用分子量标准比较判断 PCR 片段大小。

8.6 结果判定

BLV 阳性对照出现 444 bp 目的条带,且 BLV 阴性对照无相应条带,实验成立。

阳性样本和阳性对照片段大小为 444 bp;阴性样本无 444 bp 目的片段。

为了进一步验证检测结果,可将 PCR 产物进行测序,如果测序结果与目的基因序列一致,则判该样品中含有 BLV。

9 实时荧光 PCR

9.1 试剂耗材

9.1.1 商品化 DNA 提取试剂盒。

9.1.2 商品化 2 \times 实时荧光定量 PCR 预混液(2 \times PCR master mix)。

9.1.3 微量可调移液器(10 μL ~100 μL ,20 μL ~200 μL ,100 μL ~1 000 μL)以及相应滤芯吸头。

9.1.4 实时荧光定量 PCR 扩增管。

9.2 仪器设备

9.2.1 实时荧光定量 PCR 扩增仪。

9.2.2 台式高速离心机。

9.2.3 微量可调移液器(10 μL ~100 μL ,20 μL ~200 μL ,100 μL ~1 000 μL)以及相应滤芯吸头。

9.3 引物探针

鉴定 *pol* 基因的引物探针序列及其实时荧光 PCR 产物长度见表 4,特异性扩增片段序列见附录 C。

表 4 *pol* 基因的引物探针序列及其实时荧光 PCR 产物长度

引物名称	序列	引物长度, bp	扩增片段大小, bp
MRBLVL	CCTCAATTCCCTTTAAACTA	20	120
MRBLVR	GTACCGGGAAGACTGGATTA	20	
MRBLV probe	5'-FAM-GAACGCCTCCAGGCCCTTCA-BHQ1-3'	20	

9.4 实验步骤

9.4.1 核酸提取

步骤同 8.5.1。

实时荧光 PCR 扩增体系见表 5。

表 5 实时荧光 PCR 扩增体系

组成	体积, μL
2 \times PCR master mix	12.5
引物 MRBLVL(10 $\mu\text{mol/L}$)	1
引物 MRBLVR(10 $\mu\text{mol/L}$)	1
MRBLV probe(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.5
模板(基因组 DNA, 500 ng)	X(一般为 5)
双蒸水	10-X
总计	25

9.4.2 反应程序

95 °C 15 min,1个循环;94 °C 60 s,60 °C 60 s,50个循环,在每次循环的退火时收集荧光。

9.5 结果判定

阳性对照 C_t 值 ≤ 40 ,且出现特征性扩增曲线,阴性对照无 C_t 值,且无特征性扩增曲线,试验成立。被检样品 C_t 值小于或等于 40 判定为 BLV 核酸阳性;阴性样品是没有 C_t 值或 C_t 值大于 50 判定为 BLV 核酸阴性;被检样品 $40 < C_t$ 值 ≤ 50 且出现特征性扩增曲线,样品检测结果判为疑似,疑似样品应重新检测,若 C_t 值 < 50 ,判定为 BLV 核酸阳性,若 C_t 值 ≥ 50 ,判定为 BLV 核酸阴性。

10 阻断 ELISA

10.1 试剂耗材

- 10.1.1 包被抗原:BLV-gp51 抗原。
- 10.1.2 对照血清:BLV 阴性对照血清、BLV 阳性对照血清。
- 10.1.3 浓缩酶标抗体:抗 gp51 辣根过氧化物酶标记物。
- 10.1.4 $10\times$ 浓缩洗涤液,配制方法按照附录 D 中 D.1 的规定执行。
- 10.1.5 底物液,配制方法按照 D.2 的规定执行。
- 10.1.6 终止液,配制方法按照 D.3 的规定执行。
- 10.1.7 微量可调移液器($10\ \mu\text{L}\sim 100\ \mu\text{L}$, $20\ \mu\text{L}\sim 200\ \mu\text{L}$, $100\ \mu\text{L}\sim 1\ 000\ \mu\text{L}$)及相应滤芯吸头。
- 10.1.8 八通道移液器($50\ \mu\text{L}\sim 300\ \mu\text{L}$)及相应滤芯吸头。
- 10.1.9 96 孔酶标板。

10.2 仪器设备

- 10.2.1 酶标仪。
- 10.2.2 恒温培养箱。
- 10.2.3 洗板机。
- 10.2.4 台式离心机。

10.3 实验操作

10.3.1 加样

取出包被板,在每个反应孔中加入 $50\ \mu\text{L}$ 稀释液,在 2 个阴性对照孔和 2 个阳性对照孔中分别加入阴性对照血清和阳性对照血清,每孔各 $50\ \mu\text{L}$ 。在待测样品孔中加入 $50\ \mu\text{L}$ 未稀释的牛血清样品。

10.3.2 孵育

振荡混匀,盖上封板膜, $18\ ^\circ\text{C}\sim 26\ ^\circ\text{C}$ 孵育(30 ± 3)min。

10.3.3 洗板

弃去包被板中液体,用 $300\ \mu\text{L}$ 的洗涤液,每个孔洗涤 3 次。在每一次洗涤后,吸去每个板孔中的液体,在最后一次甩掉后,在吸水材料上用力扣板,吸去剩余的液体。

10.3.4 加入酶标抗体

每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 用洗涤液 100 倍稀释的酶标抗体,盖上封板膜, $18\ ^\circ\text{C}\sim 26\ ^\circ\text{C}$ 孵育(60 ± 5)min。

10.3.5 洗板

按 10.3.3 方法洗板。

10.3.6 加底物

每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 底物液, $18\ ^\circ\text{C}\sim 26\ ^\circ\text{C}$ 避光孵育 (20 ± 3) min。

10.3.7 反应终止

每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 终止液。

10.3.8 读取吸光度

在 $450\ \text{nm}$ 条件下,测量并记录每个样品和对照的 OD 值。

10.4 实验结果判定

10.4.1 结果计算

阴性对照 OD 平均值(NC) = (NC1+NC2)/2

阳性对照 OD 平均值(PC) = (PC1+PC2)/2

$$S/N\% = 100 \times \text{样品} / \overline{NCX}$$

10.4.2 实验成立条件

$$\overline{NCX} \geq 0.6; \overline{PCX} / \overline{NCX} \leq 0.2$$

10.4.3 结果判定

S/N% ≥ 40, 判定为 BLV 抗体阴性; S/N% < 40, 判定为 BLV 抗体阳性。

11 琼脂凝胶免疫扩散 (AGID)

11.1 试剂耗材

11.1.1 抗原: 含有 BLV 的特异性糖蛋白 gp51。

11.1.2 对照血清: BLV 阴性对照血清、BLV 弱阳性对照血清、BLV 阳性对照血清。

11.1.3 试剂级琼脂糖。

11.1.4 8.5% NaCl 的 0.2 mol/L Tris 缓冲液 (pH 7.2), 配制方法按照附录 E 的规定执行。

11.1.5 微量可调移液器 (10 μL~100 μL, 20 μL~200 μL, 100 μL~1 000 μL) 及相应滤芯吸头。

11.2 仪器设备

11.2.1 培养皿。

11.2.2 恒温培养箱。

11.2.3 水浴锅或微波炉。

11.2.4 六边形打孔器 (内径 5 mm)。

11.2.5 电子天平 (0.1 mg)

11.2.6 4 °C 冰箱

11.3 实验操作

11.3.1 琼脂平板制备

琼脂在水浴锅或微波炉内加热融化, 每平皿 (直径 8.5 cm) 倒 15 mL, 4 °C 冰箱冷却凝固。

11.3.2 打孔

用六边形打孔器打 1 个中心孔及其外周呈六边形排列的 6 个孔并封底 (见图 1)。

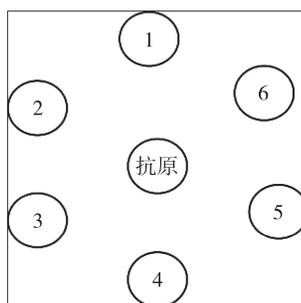


图 1 琼脂凝胶平板打孔编号图示

11.3.3 加样

中央孔加入 BLV 抗原, 1、3、5 孔分别加入待检血清样品, 2、4、6 孔加入标准阳性血清。加至孔满, 平皿加盖。

11.3.4 孵育

将平皿盖上平皿盖,放入湿盒内。将湿盒置于 20℃~27℃ 培养,分别在 24 h、48 h、72 h 读取结果。

11.3.5 实验成立条件

阳性对照血清孔与抗原孔之间形成一条清晰、致密的白色沉淀线,弱阳性对照血清孔与抗原之间形成一条比较清晰但不致密的白色沉淀线,实验有效。如果阳性对照不产生预期结果,则实验无效。

11.3.6 结果判定

待测血清与抗原形成一条特异性沉淀线,并与阳性对照血清形成的线一致,则判为 BLV 抗体阳性。待测血清使阳性对照血清线向抗原孔弯曲,但不与抗原形成可见的沉淀线,则为 BLV 抗体弱阳性。待测血清与抗原没有形成一条特异性沉淀线,并且不使阳性对照血清线弯曲,则为 BLV 抗体阴性。

12 综合判定

符合 5.5,且 8.6、9.5、10.4.3、11.3.6 任何一项阳性者,判定为牛白血病。

附 录 A
(规范性)
PCR 试验用溶液的配制

A.1 50×TAE 电泳缓冲液

配制 50×TAE 电泳缓冲液所需试剂如下：

- a) 242 g, 2 mol Tris;
- b) 37.2 g, 0.1 mol $\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。

加入去离子水 800 mL, 充分搅拌溶解。加入 57.1 mL 的冰乙酸, 充分溶解。加去离子水定容至 1 L。

A.2 1×TAE 电泳缓冲液

取 4 mL 50×TAE 电泳缓冲液、196 mL 去离子水, 混合后充分搅拌均匀。

A.3 2% 琼脂糖凝胶

取 2 g 琼脂糖(电泳级), 100 mL TAE 电泳缓冲液(1×), 加入三角锥形瓶中, 在微波炉中溶解琼脂糖, 待沸腾溶解后加入核酸染料, 摇动使染料均匀分布于胶液中, 然后倒胶, 待其凝固后即可使用。

附 录 B

(资料性)

巢式 PCR 方法的特异性片段

B.1 BLV *env* 基因第一轮扩增片段序列

TCTGTGCCAAGTCTCCCAGATACACCTTGGACTCTGTAAATGGCTATCCTAAGATCTACT
GGCCCCCCCCACAAGGGCGGCGCCGGTTTGGAGCCAGGGCCATGGTCACATATGATTGCGAGC
CCCGATGCCCTTATGTGGGGCAGATCGGTTGACTGCCCCACTGGGACAATGCCTCCCAGG
CTGATCAAGGATCCTTTTATGTCAATCATCAGATTTTATTCCTGCATCTCAAACAATGTCAT
GGAATTTTCA CTCTAACCTGGGAGATATGGGGATATGATCCCCTGATCACCTTTTCTTTACA
TAAGATCCCTGATCCCCCTCAACCCGACTTTCCCAGTTGAACAGTGACTGGGTTCCTCTGTC
AGATCATGGGCCCTGCTTTTAAATCAAACAGCACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGG
GAACCTTCCCCTCCCTGGGCTCCCGAAATATTAGTATATAACAAAACCATCTCCAGCTCTGGA
CCCGCCTCGCCCTCCCGGACGCCAAATCTTCTGGGTCAACTCGTCCTCGTTTAAACACCACCC
AAGGATGGCACCACCCTTCCCAGAGGTTGTTGTT

B.2 BLV *env* 基因第二轮扩增片段序列

CCCACAAGGGCGGCGCCGGTTTGGAGCCAGGGCCATGGTCACATATGATTGCGAGCCCCGA
TGCCCTTATGTGGGGCAGATCGGTTGACTGCCCCACTGGGACAATGCCTCCCAGGCTGAT
CAAGGATCCTTTTATGTCAATCATCAGATTTTATTCCTGCATCTCAAACAATGTCATGGAAT
TTTCACTCTAACCTGGGAGATATGGGGATATGATCCCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAGAT
CCCTGATCCCCCTCAACCCGACTTTCCCAGTTGAACAGTGACTGGGTTCCTCTGTCAGATCA
TGGGCCCTGCTTTTAAATCAAACAGCACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCT
TCCCCTCCCTGGGCTCCCGAAATATTAGTATATAACAAAACCATCTCCAGCTCTGGACCCGGCC
TCGC

附 录 C

(资料性)

实时荧光 PCR 方法的特异性片段

实时 PCR 的扩增片段序列：

CCTCAATTCCCTTTAAACTAGAACGCCTCCAGGCCCTTCAAGACCTGGTCCATCGCTCTC
TGGAGGCAGGTTATATCTCCCCCTGGGACGGGCCAGGCAATAATCCAGTCTTCCCGGTAC

附 录 D
(规范性)
阻断 ELISA 溶液的配制

D.1 10×浓缩洗涤液

称取 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 29 g、 KH_2PO_4 2 g、NaCl 80 g、KCl 2 g,加入 800 mL 灭菌纯化水搅拌溶解,再加入 1 mL ProClin 300、10 mL 的吐温 20,加灭菌纯化水定容至 1 000 mL,过滤除菌,2℃~8℃保存。使用前,将 10×浓缩洗涤液用蒸馏水(或去离子水)10 倍稀释,即 1 份 10 倍浓缩洗涤液加 9 份蒸馏水(或去离子水)。

D.2 底物液

A 液:称取柠檬酸 5.76 g、过氧化脲 0.5 g、乙酸钠 6.21 g,加入 800 mL 灭菌纯化水搅拌溶解,再加入 ProClin 300 0.5 mL,而后加纯化水定容至 1 000 mL,过滤除菌,2℃~8℃保存。

B 液:称取柠檬酸 5.76 g、TMB 0.2 g,加入甲醇 100 mL 溶解,再加入 ProClin 300 0.5 mL,最后加灭菌纯化水定容至 1 000 mL,过滤除菌,2℃~8℃避光保存。

A 液、B 液等体积混匀即为底物液。

D.3 终止液(0.5 mol/L 硫酸)

量取灭菌纯化水 800 mL,缓慢加入浓硫酸(18.4 mol/L)27.2 mL,搅拌均匀,而后加灭菌纯化水定容至 1 000 mL,2℃~8℃保存。

附 录 E

(规范性)

琼脂凝胶免疫扩散溶液的配制

8.5% NaCl 的 0.2 mol/L Tris 缓冲液(pH 7.2) 配制方法:

称取三羟甲基氨基甲苯(Tris methylamine) 24.33 g,加灭菌纯化水定容至 1 000 mL,用 2.5 mol/L 盐酸调 pH 至 7.2。将 NaCl 85 g 溶于 250 mL Tris/HCl 中,加灭菌纯化水定容至 1 000 mL。
