

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 544—2025

代替 NY/T 544—2015

猪流行性腹泻诊断技术

Diagnostic techniques for porcine epidemic diarrhea

2025-01-09 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 544—2015《猪流行性腹泻诊断技术》,与 NY/T 544—2015 相比,除结构调整和编辑性改动外,主要技术变化如下:

- a) 增加了样品采集与处理(见第7章);
- b) 增加了间接免疫荧光法(见第10章);
- c) 增加了实时荧光反转录-聚合酶链式反应(见第13章);
- d) 更改了间接酶联免疫吸附试验(见第15章,2015年版的6.6);
- e) 增加了综合判定(见第16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:中国农业科学院哈尔滨兽医研究所、黑龙江八一农垦大学。

本文件主要起草人:冯力、陈建飞、时洪艳、张鑫、郭龙军、石达、孙东波。

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 544—2002,2015年第一次修订;

——本次为第二次修订。



猪流行性腹泻诊断技术

1 范围

本文件规定了猪流行性腹泻的临床诊断、样品采集与处理和实验室诊断方法的技术要求。
本文件适用于猪流行性腹泻的诊断、监测。

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 19489 实验室 生物安全通用要求

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CPE:细胞病变作用(Cytopathic effect)

DAPI:4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole)

DIFA:直接免疫荧光法(Direct immunofluorescence assay)

ELISA:酶联免疫吸附试验(Enzyme-linked immunosorbent assay)

FA:荧光抗体(FITC-labeled antibody)

FITC:异硫氰酸荧光素(Fluorescein isothiocyanate)

IDIFA:间接免疫荧光法(Indirect immunofluorescence assay)

PBS:磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline)

PED:猪流行性腹泻(Porcine epidemic diarrhea)

PEDV:猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus)

Real-time RT-PCR:实时荧光反转录、聚合酶链式反应(Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction)

RT-PCR:反转录-聚合酶链式反应(Reverse transcription-polymerase chain reaction)

5 临床诊断

5.1 流行病学

5.1.1 PED 一年四季均可发生,主要发生在寒冷季节。

5.1.2 不同日龄的猪均可感染,尤其是7日龄以内的哺乳仔猪,发病率和死亡率可高达100%。

5.1.3 病猪、带毒猪和隐性感染猪是主要传染源。

5.1.4 病毒通过粪-口途径、带毒母猪乳汁、胎盘、空气进行传播。病毒常存在于粪便中,污染环境、饲料、饮水和用具等。

5.2 临床症状

5.2.1 病猪通常表现为呕吐,多发生在吮乳或吃食后,吐出的胃内容物呈黄色或乳白色。伴随着水样腹泻,腹泻物呈黄色、灰色,或呈水样,顺肛门流出,沾污臀部及活动区域。

5.2.2 哺乳仔猪表现脱水、眼窝下陷、行走蹒跚、精神沉郁、扎堆蜷缩在母猪腹部、食欲减退或停食。

5.2.3 死淘与猪只日龄大小有关。7日龄以内哺乳仔猪在发生腹泻3 d~4 d后,常因严重脱水而死亡。

5.2.4 断奶仔猪、育肥猪症状较轻,表现精神不振、厌食,持续腹泻2 d~3 d后逐渐恢复正常,少数猪生长发育不良。

5.2.5 成年猪、母猪表现为厌食、一过性腹泻,少数表现为呕吐或流产。

5.3 病理变化

5.3.1 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。

5.3.2 肠系膜充血及肠系膜淋巴结肿大。

5.3.3 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(见附录A中的图A.1),绒毛高度与隐窝深度从正常的7:1降低为3:1。

5.3.4 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。

5.3.5 小肠细胞变得扁平、脱落。在结肠也可见到细胞变化,但未见到脱落。

5.4 结果判定

符合5.1且满足5.2或5.3的病例,可判为PED疑似病例。确诊应采集有典型临床症状猪只的粪便、小肠及其内容物进行实验室诊断。

6 生物安全措施

进行猪流行性腹泻的诊断、检测时,如动物剖检、样品采集与处理、核酸处理等,按照GB 19489的规定执行。

7 样品采集与处理

7.1 仪器设备

7.1.1 手术刀、剪刀和镊子。

7.1.2 微量移液器及配套吸头。

7.1.3 振荡器。

7.1.4 组织匀浆器。

7.1.5 台式低温高速离心机。

7.1.6 冰箱(-20℃)。

7.2 试剂材料

7.2.1 0.02 mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲液(PBS),配制方法按照附录B中的B.1的规定执行。

7.2.2 青霉素(100 000 IU/L)。

7.2.3 链霉素(100 000 μg/L)。

7.2.4 医用防护服。

7.2.5 样品保存管(2 mL、25 mL、50 mL)。

7.2.6 离心管(2 mL、15 mL、50 mL)。

7.3 样品采集

7.3.1 粪便

选取临床症状典型的发病猪只,用灭菌注射器吸取其粪便1 mL~2 mL或轻轻挤压发病猪的腹部,从其肛门处采集1 mL~2 mL粪便,放入含等体积无菌PBS(含终浓度1 000 IU/mL青霉素、1 000 μg/mL链霉素)的样品保存管中,于-20℃保存。

7.3.2 小肠及其内容物

用手术刀剖开病死猪腹腔,分别在十二指肠和直肠两端结扎并在结扎线外端剪断,然后放入样品保存管,于 -20°C 保存。

7.4 样品处理

7.4.1 粪便

将含粪便的样品保存管在室温解冻,剧烈振荡($2\,000\text{ r/min}$) $3\text{ min}\sim 5\text{ min}$, 4°C 条件下 $3\,000\text{ r/min}$ 离心 30 min ,取上清液进行检测或于 -20°C 保存备用。

7.4.2 小肠及其内容物

将小肠及其内容物匀浆,用含终浓度 $1\,000\text{ IU/mL}$ 青霉素、 $1\,000\text{ }\mu\text{g/mL}$ 链霉素的无菌 PBS 制成 5 倍悬液, 4°C 条件下 $3\,000\text{ r/min}$ 离心 30 min ,取上清液进行检测或于 -20°C 保存备用。

8 病毒分离与鉴定

8.1 仪器设备

8.1.1 二级生物安全柜。

8.1.2 倒置显微镜。

8.1.3 冰箱($2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 、 -20°C)。

8.1.4 台式低温高速离心机。

8.1.5 微量移液器及配套吸头。

8.1.6 CO_2 恒温培养箱。

8.2 试剂材料

8.2.1 细胞培养液,配制方法按照 B.2 的规定执行。

8.2.2 病毒培养液,配制方法按照 B.3 的规定执行。

8.2.3 0.25% 胰酶。

8.2.4 微孔滤膜。

8.2.5 细胞培养瓶。

8.2.6 Vero 细胞系。

8.3 样品制备

取 7.4 上清液,经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌,获得过滤液,立即使用或于 -20°C 保存备用。

8.4 病毒分离

8.4.1 细胞单层制备

按常规方法将 Vero 细胞悬液分装到 25 cm^2 或 75 cm^2 的细胞培养瓶中,每瓶 5 mL 或 15 mL ,细胞浓度为 2×10^5 个/ $\text{mL}\sim 3\times 10^5$ 个/ mL , 37°C 静置培养 $48\text{ h}\sim 72\text{ h}$ 。

8.4.2 接种及观察

用病毒培养液对 Vero 细胞单层轻轻洗 3 遍。取 8.3 中过滤液 0.5 mL (1.5 mL) 接种于 25 cm^2 (75 cm^2) 细胞单层上,同时加 0.25 mL (0.75 mL) 病毒培养液、混匀, 37°C 吸附 1 h ,补加病毒培养液至 5 mL (15 mL)。正常细胞对照, 25 cm^2 (75 cm^2) 细胞培养瓶加 5 mL (15 mL) 病毒培养液, 37°C 静置培养。接种后,逐日观察 CPE,连续 $72\text{ h}\sim 96\text{ h}$,记录 CPE。若有 CPE,收获细胞/病毒液,置于 -20°C 保存备用。

8.4.3 盲传

如接种细胞未出现 CPE,则收获细胞/病毒液,按 8.4.2 方法进行盲传,根据 CPE 变化情况可盲传 2 代 $\sim$ 3 代。

8.5 结果判定

8.5.1 CPE 观察结果

接种细胞面粗糙,颗粒增多,有多核细胞出现(7个~8个甚至几十个),并可见空斑样小区,细胞逐渐脱落;正常对照细胞单层完好,形态完整、表面光滑(见附录C中的图C.1)。

8.5.2 判定

当接种细胞出现CPE,判定为病毒分离疑似阳性。可用直接免疫荧光法(见第9章)、间接免疫荧光法(见第10章)和RT-PCR(见第12章)中的任何一种方法进行确诊。

9 直接免疫荧光法

9.1 仪器设备

- 9.1.1 荧光显微镜。
- 9.1.2 冷冻切片机。
- 9.1.3 恒温培养箱。
- 9.1.4 微量移液器及配套吸头。
- 9.1.5 冰箱(4℃)。
- 9.1.6 滴管。

9.2 试剂材料

- 9.2.1 PBS,配制方法按照B.1的规定执行。
- 9.2.2 伊文思蓝溶液,配制方法按照B.4的规定执行。
- 9.2.3 磷酸盐缓冲甘油,配制方法按照B.5的规定执行。
- 9.2.4 丙酮(分析纯)。
- 9.2.5 荧光抗体(FA),制备见附录D中的D.1。
- 9.2.6 PEDV,见D.2。
- 9.2.7 阳性标本片,制备见D.3。
- 9.2.8 阴性标本片,制备见D.4。
- 9.2.9 Vero细胞系。
- 9.2.10 载玻片。
- 9.2.11 盖玻片。

9.3 操作方法

9.3.1 标本片制备

9.3.1.1 组织标本

将急性期(2d~3d)患病猪空肠(中段)制成4μm~7μm冰冻切片,室温风干。于丙酮中固定15min,再置于PBS中浸泡10min~15min,室温风干。

9.3.1.2 细胞载玻片标本

将接种24h~48h Vero细胞载玻片及PEDV感染的Vero细胞和正常Vero细胞载玻片在PBS中洗3次,风干。于丙酮中固定15min,再置于PBS中浸泡10min~15min,室温风干。

9.3.2 染色

用0.02%伊文思蓝溶液将FA稀释至工作浓度(1:8以上合格)。4000r/min离心10min,取上清液滴于标本上,37℃恒温恒湿染色30min,取出后用PBS冲洗3次,依次为3min、4min、5min,室温风干。

9.3.3 封固

滴加磷酸盐缓冲甘油,用盖玻片封固,荧光显微镜检查。如当日检查不完则将荧光片置于4℃冰箱中避光保存,不超过48h内检查。

9.4 结果判定

在荧光显微镜下检查,被检标本的细胞结构应完整清晰,并在阳性标本片、阴性标本片(见图D.5)均

成立时判定。若在胞浆中见到特异性绿色荧光,则判定为阳性;反之,则判定为阴性。

10 间接免疫荧光法

10.1 仪器设备

10.1.1 荧光显微镜。

10.1.2 恒温培养箱。

10.1.3 小型摇床。

10.1.4 微量移液器及配套吸头。

10.1.5 冰箱(4℃)

10.2 试剂材料

10.2.1 PBS,配制方法按照 B.1 的规定执行。

10.2.2 Vero 细胞系。

10.2.3 PEDV(同 9.2.6)。

10.2.4 载玻片。

10.2.5 细胞培养板。

10.2.6 丙酮(分析纯)。

10.2.7 4%多聚甲醛。

10.2.8 PEDV 阳性猪血清(见附录 E 中的 E.1)。

10.2.9 PEDV 阴性猪血清(见 E.2)。

10.2.10 FITC 标记兔抗猪 IgG 抗体。

10.2.11 DAPI 染色剂。

10.3 操作方法

10.3.1 标本片制备

10.3.1.1 细胞载玻片标本

同 9.3.1.2。

10.3.1.2 细胞培养板标本

将分离毒细胞、PEDV 感染细胞(阳性对照)和正常细胞(阴性对照)培养 24 h~48 h,用 PBS 洗 3 次,每次 3 min,室温风干。于 4℃、4%多聚甲醛中固定 30 min,用 PBS 洗 3 次,每次 3 min,室温风干。

10.3.2 一抗孵育

将 PEDV 阳性猪血清、阴性猪血清稀释(1:500)后,取适量加入到标本片,37℃作用 1 h,用 PBS 洗 3 次,每次 3 min,室温风干。

10.3.3 二抗孵育

将 FITC 标记的抗猪 IgG 抗体稀释(1:1 000)后,取适量加入到标本片,37℃避光作用 1 h,用 PBS 洗 3 次,每次 3 min,室温风干。

10.3.4 染核

将 DAPI 染色剂稀释(1:1 000)后,取适量加入到标本片,37℃作用 20 min,用 PBS 洗 3 次,再加入适量 PBS,荧光显微镜检查。如当日检查不完则将标本片置 4℃冰箱中避光保存,不超过 48 h 内检查。

10.4 结果判定

在荧光显微镜下检查,被检标本的细胞结构应完整清晰,并在阳性对照、阴性对照(见 E.3)均成立时判定。若在胞浆中见到特异性绿色荧光,则判定为阳性;反之,则判定为阴性;细胞核呈蓝色。

11 双抗体夹心酶联免疫吸附试验(夹心 ELISA)

11.1 仪器设备

11.1.1 酶标测试仪。

11.1.2 恒温培养箱。

11.1.3 台式离心机。

11.1.4 微量移液器及配套吸头。

11.1.5 冰箱(4℃)

11.2 试剂材料

11.2.1 包被板(96孔板)。

11.2.2 样品管。

11.2.3 洗液,配制方法按照 B.6 的规定执行。

11.2.4 包被稀释液,配制方法按照 B.7 的规定执行。

11.2.5 样品稀释液,配制方法按照 B.8 的规定执行。

11.2.6 酶标抗体稀释液,配制方法按照 B.9 的规定执行。

11.2.7 底物溶液,配制方法按照 B.10 的规定执行。

11.2.8 终止液,配制方法按照 B.11 的规定执行。

11.2.9 猪抗 PEDV-IgG(见附录 F 中的 F.1)。

11.2.10 猪抗 PEDV-IgG-HRP (HRP 为辣根过氧化物酶)(见 F.2)。

11.2.11 阳性抗原(见 F.3)。

11.2.12 阴性抗原(见 F.4)。

11.3 操作方法

11.3.1 待检样品

处理同 7.4。

11.3.2 冲洗包被板

向各孔注入洗液,浸泡 3 min、甩干,再注入洗液,重复 3 次。甩去孔内残液,在滤纸上吸干。

11.3.3 包被抗体

用包被稀释液稀释猪抗 PEDV-IgG 至使用倍数,每孔加 100 μL ,置于 4℃ 过夜,弃液,用洗液冲洗 3 次,每次 3 min。

11.3.4 加样品

将待检样品用样品稀释液做 5 倍稀释,加入两个孔,每孔 100 μL ,每块反应板设阳性抗原、阴性抗原及稀释液对照各 2 孔,置于 37℃ 作用 2 h,弃液,用洗液冲洗 3 次,每次 3 min。

11.3.5 加酶标抗体

每孔加 100 μL 经酶标抗体稀释液稀释至使用浓度的猪抗 PEDV-IgG-HRP,置于 37℃ 作用 2 h,弃液,用洗液冲洗 3 次,每次 3 min。

11.3.6 加底物溶液

每孔加新配制的底物溶液 100 μL ,置于 37℃ 作用 30 min。

11.3.7 终止反应

每孔加终止液 50 μL ,置于室温 15 min。

11.3.8 吸光度测定

用酶标测试仪在波长 492 nm 下测量各孔的吸光度(OD)值。

11.4 结果判定

11.4.1 试验成立条件

阳性抗原对照孔平均 OD 值 >0.8 (参考值),阴性抗原对照孔平均 OD 值 ≤ 0.2 。

11.4.2 计算方法

P/N 值按公式(1)计算。

$$P/N = \frac{OD_{492-P}}{OD_{492-NC}} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

P ——待检样品 OD 值;

N ——阴性抗原对照 OD 值;

OD_{492-P} ——待检样品在 492 nm 波长处的平均 OD 值;

OD_{492-NC} ——阴性抗原对照在 492 nm 波长处的平均 OD 值。

11.4.3 判定

当 P/N 值 ≥ 2 , 且待检样品平均 OD 值 ≥ 0.2 判为阳性, 否则为阴性。如其中一个条件稍低于判定标准, 可复检一次, 最后仍按照两个条件判定结果。

12 反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)

12.1 仪器设备

12.1.1 PCR 扩增仪。

12.1.2 电热恒温水槽。

12.1.3 台式高速低温离心机。

12.1.4 电泳仪和水平电泳槽。

12.1.5 微量移液器及配套吸头。

12.1.6 微波炉。

12.1.7 紫外凝胶成像仪。

12.1.8 冰箱(4℃, -70℃)。

12.2 试剂材料

12.2.1 变性剂: 6 mol/L 异硫氰酸胍或 Trizol 试剂。

12.2.2 酚氯仿抽提液: 苯酚、三氯甲烷、异戊醇(25:24:1)混合液。

12.2.3 异丙醇(分析纯)。

12.2.4 DEPC 水; 焦磷酸二乙酯按 0.1% 含量加入去离子水中配制而成。

12.2.5 75% 乙醇: 无水乙醇(分析纯)与 DEPC 水按 3:1 配制而成。

12.2.6 核糖核酸酶抑制剂(RNase inhibitor)(40 U/ μ L)。

12.2.7 反转录酶(M-MLV)(200 U/ μ L)。

12.2.8 5×M-MLV 缓冲液。

12.2.9 dNTPs 混合物(各 10 mmol/L)。

12.2.10 2×PCR Master Mix。

12.2.11 灭菌去蒸水。

12.2.12 1×TAE 电泳缓冲液, 配制方法见附录 G 中的 G.1)。

12.2.13 琼脂糖: 国产或进口的低熔点琼脂糖。

12.2.14 电泳加样缓冲液, 配制方法见 G.2)。

12.2.15 DNA Marker(标准分子量): 分子大小范围为 100 bp~2 000 bp。

12.2.16 1.5 mL 离心管。

12.2.17 0.2 mL PCR 反应管。

12.2.18 引物

正向引物(PEDV-F):5'-CCTAGACTTCAACCTTACGA-3'(10 μmol/L);

反向引物(PEDV-R):5'-CAGGAAAAAGAGTACGAAAA-3'(10 μmol/L);

反转录引物(RP):5'-GGTGACAAGTGAAGCACAGA-3'(10 μmol/L)。

12.3 样品制备

12.3.1 待检样品:粪便、小肠及内容物(处理同 7.4),接毒细胞。

12.3.2 阳性对照:已知病毒材料,如 PEDV 感染的细胞。

12.3.3 阴性对照:正常细胞或灭菌去离子水。

12.4 操作方法

12.4.1 病毒 RNA 提取

取待检样品、阴性对照和阳性对照各 300 μL 分别置于 1.5 mL 无 RNA 酶的灭菌离心管中,加入 500 μL RNA 提取液,充分混匀,室温静置 10 min;加入 500 μL 三氯甲烷,充分混匀,室温静置 10 min,4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min,取上清液(500 μL)于新的 1.5 mL 无 RNA 酶的离心管中,加入 1.0 mL 异丙醇,充分混匀,-20 ℃静置 30 min,4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min;弃掉上清液,将离心管倒置于吸水纸上,室温自然风干,加入 20 μL 无 RNase dH₂O 溶解 RNA 沉淀,瞬时离心,立即使用或-70 ℃保存备用。

注:可采用等效 RNA 提取方法,如全自动化核酸提取仪和配套核酸抽提试剂进行核酸提取。

12.4.2 cDNA 合成

取制备的病毒 RNA 12.5 μL 于 1.5 mL 无 RNA 酶的灭菌离心管中,加入 1 μL 反转录引物(RP)混匀,70 ℃保温 10 min,冰浴 2 min,瞬时离心使模板 RNA/引物混合液聚集于管底,将管置于冰上,依次加入 4 μL 5×M-MLV 缓冲液、1 μL dNTPs 混合物(各 10 mol/L)、0.5 μL RNase 抑制剂、1.0 μL 反转录酶 M-MLV,混匀,42 ℃保温 1 h;70 ℃保温 15 min,冰浴 5 min,得到 cDNA 溶液,立即使用或置于-20 ℃保存。

12.4.3 PCR 反应

12.4.3.1 反应体系(25 μL)

在 PCR 管中依次加入 2×PCR Master Mix 12.5 μL、正向引物(PEDV-F) 0.5 μL、反向引物(PEDV-R) 0.5 μL、cDNA(待检样品、阴性对照、阳性对照)2 μL、无菌去离子水 9.5 μL,混匀,备用。

12.4.3.2 反应条件

94 ℃预变性 5 min;98 ℃变性 10 s、55 ℃退火 30 s、72 ℃延伸 50 s,30 个循环;72 ℃延伸 7 min,4 ℃保存。

12.4.4 扩增产物检测

12.4.4.1 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)或 EB 替代物 5 μL,均匀铺板,厚度为 3 mm~5 mm。

12.4.4.2 电泳

取待检样品、阳性对照、阴性对照 PCR 扩增产物和 DNA Marker(DL2,000)各 5 μL,依次加入到琼脂糖凝胶孔中,150 V 电压,10 min~15 min。

12.4.4.3 观察记录

用紫外凝胶成像仪观察检测结果、拍照并记录试验结果。

12.5 结果判定

阳性对照出现 774 bp(序列见附录 H 中的 H.1)左右特异性条带、阴性对照没有预期的目的条带(见图 H.1)。若待检样品泳道出现 774 bp 左右的目的条带,判为阳性(+);反之,判为阴性(-)。若进一步验证,可对扩增产物进行测序。

13 实时荧光反转录-聚合酶链式反应(实时荧光 RT-PCR)

13.1 仪器设备

13.1.1 荧光定量 PCR 扩增仪。

13.1.2 台式低温高速离心机。

13.1.3 微量移液器及配套吸头。

13.2 试剂材料

13.2.1 $2\times$ One step SYBR RT-PCR buffer。

13.2.2 Ex Taq HS ($5\text{U}/\mu\text{L}$)。

13.2.3 PrimeScript RT Enzyme Mix。

13.2.4 灭菌无 RNase 去离子水。

13.2.5 引物

PEDV-F1: $5'$ -GCACTTATTGGCAGGCTTTGT- $3'$ ($10\ \mu\text{mol/L}$);

PEDV-R1: $5'$ -CCATTGAGAAAAGAAAGTGTCGTAG- $3'$ ($10\ \mu\text{mol/L}$)。

13.2.6 离心管。

13.2.7 PCR 扩增管 ($0.2\ \text{mL}$)。

13.3 样品制备

同 12.3。

13.4 操作方法

13.4.1 病毒 RNA 提取

同 12.4.1。

13.4.2 反应体系 ($20\ \mu\text{L}$)

在 PCR 管中依次加入 $2\times$ One step SYBR RT-PCR buffer $10\ \mu\text{L}$ 、Ex Taq HS ($5\ \text{U}/\mu\text{L}$) $1\ \mu\text{L}$ 、PrimeScript RT Enzyme Mix $1\ \mu\text{L}$ 、正向引物 (PEDV-F1) $1\ \mu\text{L}$ 、反向引物 (PEDV-R1) $1\ \mu\text{L}$ 、RNA (待检样品、阴性对照、阳性对照) $2\ \mu\text{L}$ 、DEPC 水 $4\ \mu\text{L}$ ，混匀，备用。

13.4.3 反应程序

反转录 $42\ ^\circ\text{C}$, $5\ \text{min}$; $95\ ^\circ\text{C}$, $10\ \text{s}$ 。PCR 反应 $95\ ^\circ\text{C}$, $5\ \text{s}$; $61\ ^\circ\text{C}$, $20\ \text{s}$ (检测荧光信号)，进行 40 个循环。熔解曲线分析 $95\ ^\circ\text{C}$, $15\ \text{s}$; $60\ ^\circ\text{C}$, $1\ \text{min}$; $95\ ^\circ\text{C}$, $1\ \text{s}$ 。

13.5 结果判定

13.5.1 试验成立条件

序列见附录 I 中的 I.1。阳性对照扩增曲线有明显对数增长期，且 C_t 值 <20 ；同时，阴性对照扩增曲线无对数增长期 (见图 I.1)。

13.5.2 判定

样品 C_t 值 ≤ 30 ，且出现标准的 S 形扩增曲线，判为阳性；样品无 C_t 值或 C_t 值 >35 ，且无标准扩增曲线，判为阴性；样品 $30 < C_t$ 值 ≤ 35 ，且有标准扩增曲线，判为可疑，需重新检测。如重复后仍然为上述结果，判为阳性；否则判为阴性。

14 血清中和试验

14.1 仪器设备

14.1.1 恒温培养箱。

14.1.2 电热恒温水槽。

14.1.3 微量移液器及配套吸头。

14.1.4 低温冰箱(−30℃、−70℃)。

14.1.5 微量振荡器。

14.1.6 倒置显微镜。

14.2 试剂材料

14.2.1 液体培养基(RPMI1640)。

14.2.2 细胞培养液,配制方法按照 B.2 的规定执行。

14.2.3 病毒培养液,配制方法按照 B.3 的规定执行。

14.2.4 0.25%胰酶。

14.2.5 Vero 细胞系。

14.2.6 PEDV,同 9.2.6。

14.2.7 PEDV 阳性猪血清,同 10.2.8。

14.2.8 PEDV 阴性猪血清,同 10.2.9。

14.2.9 待检血清,经 56℃水浴灭活 30 min 的猪血清。

14.2.10 96 孔微量培养板。

14.3 操作方法

14.3.1 用 RPMI1640 液体培养基 2 倍系列稀释血清,每份血清加 4 孔,每孔 50μL,再分别加 50μL 含 100 TCID₅₀ 的病毒液。

14.3.2 经微量振荡器振荡 1 min~2 min,置于 37℃中和 1 h(中间摇动 2 次)。

14.3.3 每孔加细胞悬液 100 μL(20 万~30 万个细胞/mL),置于 37℃温箱培养。每日观察 CPE,连续观察 5 d。

14.3.4 设阴性血清对照、阳性血清对照、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 2⁻⁶ 稀释。

14.3.5 观察记录结果,按 Reed-Muench 方法计算其半数保护量,然后计算出血清的中和效价。

14.4 结果判定

14.4.1 试验成立条件

病毒对照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。

14.4.2 判定

血清中和效价 1:8 或以上,判为阳性;1:4 为疑似;小于 1:4,判为阴性。疑似血清复检一次,仍为可疑时,则判为阴性。

15 间接酶联免疫吸附试验(间接 ELISA)

15.1 仪器设备

15.1.1 酶标测试仪。

15.1.2 恒温培养箱。

15.1.3 台式离心机。

15.1.4 微量移液器及配套吸头。

15.2 试剂材料

15.2.1 包被板(96 孔板)。

15.2.2 样品管(1.5 mL)。

15.2.3 兔抗猪 IgG 酶标抗体。

15.2.4 洗液,配制方法按照 B.6 的规定执行。

15.2.5 包被稀释液,配制方法按照 B.7 的规定执行。

- 15.2.6 样品稀释液,配制方法按照 B.8 的规定执行。
- 15.2.7 酶标抗体稀释液,配制方法按照 B.9 的规定执行。
- 15.2.8 底物溶液,配制方法按照 B.10 的规定执行。
- 15.2.9 终止液,配制方法按照 B.11 的规定执行。
- 15.2.10 PEDV 阳性猪血清,同 10.2.8。
- 15.2.11 PEDV 阴性猪血清,同 10.2.9。
- 15.2.12 待检血清样品。
- 15.2.13 PEDV 重组 N 蛋白(见附录 J)。

15.3 操作方法

15.3.1 冲洗包被板

向各孔注入洗液,浸泡 3 min,甩干,再注入洗液,重复 3 次,甩干孔内残液,在滤纸上吸干。

15.3.2 抗原包被

用包被稀释液稀释 PEDV 重组 N 蛋白至使用浓度,每孔加 100 μ L,置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱湿盒内过夜。弃液,用洗液冲洗 3 次,每次 3 min。

15.3.3 加待检及对照血清

将每份待检血清样品用样品稀释液做 1:200 稀释,每孔加 100 μ L。每块反应板设阳性、阴性血清及样品稀释液对照各 2 孔,每孔 100 μ L,置于 37 $^{\circ}$ C 湿盒内 1 h。弃液,用洗液冲洗 3 次,每次 3 min。

15.3.4 加酶标抗体

用酶标抗体稀释液将兔抗猪 IgG 酶标抗体稀释至使用浓度,每孔加 100 μ L,置于 37 $^{\circ}$ C 湿盒内 1 h。弃液,用洗液冲洗 3 次,每次 3 min。

15.3.5 加底物溶液

每孔加新配制的底物溶液 100 μ L,置于 37 $^{\circ}$ C 湿盒内 5 min~10 min。

15.3.6 终止反应

每孔加终止液 50 μ L,室温作用 5 min。

15.3.7 吸光度值测定

用酶标测试仪,在波长 450 nm 下测定吸光度(OD)值。

15.4 结果判定

15.4.1 试验成立条件

阳性对照血清平均 $OD_{450\text{ nm}}$ 值 >0.6 ,阴性对照血清平均 $OD_{450\text{ nm}}$ 值 <0.15 。

15.4.2 S/P 值按公式(2)计算。

$$S/P = \frac{OD_{450-S} - OD_{450-NC}}{OD_{450-PC} - OD_{450-NC}} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- S —— 样本的吸光度值;
- P —— 阳性对照的吸光度值;
- OD_{450-S} —— 待检样品在 450 nm 波长处的 OD 值;
- OD_{450-NC} —— 阴性对照在 450 nm 波长处的平均 OD 值;
- OD_{450-PC} —— 阳性对照在 450 nm 波长处的平均 OD 值。

15.4.3 判定

待检样品 S/P 值 ≥ 0.35 时,判定为阳性;S/P 值 < 0.35 时,判定为阴性。

16 综合判定

- 16.1 凡符合 5.4,并且 8.5、9.4、10.4、11.4、12.5、13.5 中任何一项阳性者,均判定为猪流行性腹泻。

16.2 临床无明显特异性症状的猪,凡符合 12.5、13.5 中任何一项阳性者,可判定猪流行性腹泻病毒带毒(潜伏感染)。

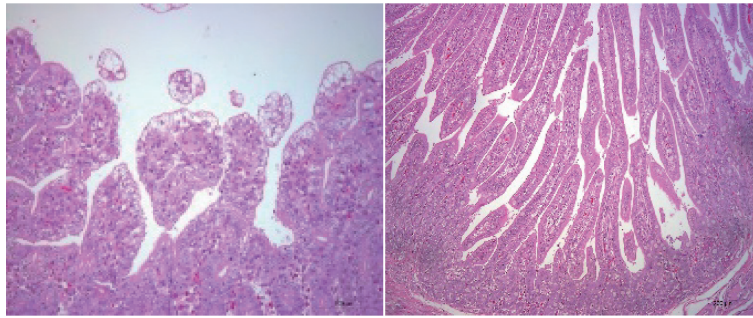
16.3 临床无明显特异性症状的非免疫猪,凡符合 14.4、15.4 任何一项阳性者,可判定曾经感染过猪流行性腹泻病毒。

附 录 A

(资料性)

猪小肠绒毛病理学组织变化(HE 染色)

PEDV 感染会导致猪小肠绒毛萎缩、变短、脱落,健康猪小肠绒毛正常,如图 A.1 所示。



a) PEDV 感染猪小肠
绒毛病理变化 (×200)

b) 健康猪小肠绒毛 (×200)

图 A.1 PEDV 感染猪小肠绒毛病理组织变化

附录 B

(规范性)

溶液的配制(试剂均为分析纯)

B.1 0.02 mol/L pH 7.2 磷酸盐缓冲液(PBS)

B.1.1 0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液的配制

称取磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)71.64 g,先加适量去离子水溶解,最后定容至1 000 mL,混匀。

B.1.2 0.2 mol/L 磷酸二氢钠溶液的配制

称取磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)31.21 g,先加适量去离子水溶解,最后定容至1 000 mL,混匀。

B.1.3 0.02 mol/L pH 7.2 磷酸盐缓冲液的配制

分别量取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,用去离子水溶解,最后定容至5 000 mL,4℃保存。

B.2 细胞培养液

含10%灭活胎牛血清的1640 营养液,加终浓度为100 IU/mL 青霉素及100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素,用5.6%碳酸氢钠(NaHCO_3)调pH至7.2。如需换液,则血清含量为5%。

B.3 病毒培养液

B.3.1 HEPES 液的配制

称取0.238 5 g HEPES 溶于100 mL 去离子水中,用1 mol/L 氢氧化钠(NaOH)调整pH至7.0~7.2,过滤后置于4℃备用。

B.3.2 病毒培养液的配制

在1640 培养液中依次加终浓度为1% HEPES、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,用5.6%碳酸氢钠(NaHCO_3)调pH至7.2。

B.4 0.1%伊文思蓝原液

称取伊文思蓝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%浓度。

B.5 磷酸盐缓冲甘油

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。

B.6 洗液

量取50 μL 吐温-20,加入100 mL 0.02 mol/L pH 7.2 的PBS中,混匀均匀即成。

B.7 包被稀释液

称取碳酸钠10.6 g,加去离子水至1 000 mL,配制成0.1mol/L 碳酸钠溶液。称取碳酸氢钠8.4 g,加去离子水至1 000 mL,配制成0.1mol/L 碳酸氢钠溶液。

分别量取0.1 mol/L 碳酸钠溶液200 mL、0.1 mol/L 碳酸氢钠溶液700 mL,混合即成。

B.8 样品稀释液

加0.05%吐温-20及1%明胶的0.02 mol/L pH 7.2 的PBS。

B.9 酶标抗体稀释液

加 0.05% 吐温-20、1% 明胶及 5% 灭活牛血清的 0.02 mol/L pH 7.2 的 PBS。

B.10 底物溶液**B.10.1 pH 5.0 磷酸盐-柠檬酸缓冲液的配制**

称取柠檬酸 21.01 g, 加去离子水至 1 000 mL, 量取 243 mL 与 0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液 (见 B.1.1) 257 mL 混合, 于 4 °C 冰箱中保存不超过 1 周。

B.10.2 底物溶液的配制

称取 40 mg 邻苯二胺, 溶于 1 000 mL pH 5.0 磷酸盐-柠檬酸缓冲液 (用前从 4 °C 冰箱中取出, 在室温下放置 20 min~30 min), 待溶解后, 加入 150 μ L 过氧化氢, 根据试验需要量可按比例增减。

B.11 终止液

2 mol/L 硫酸: 量取浓硫酸 4 mL, 加入到 32 mL 去离子水中混匀。

附 录 C
(资料性)

PEDV 感染 Vero 细胞病变和正常 Vero 细胞图

PEDV 感染的 Vero 细胞面粗糙,颗粒增多,有多核细胞出现,并可见空斑样小区,细胞逐渐脱落;正常对照细胞单层完好,形态完整、表面光滑,如图 C.1 所示。

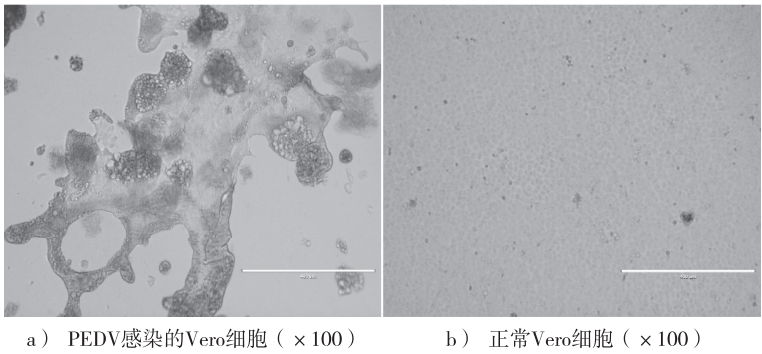


图 C.1 PEDV 感染 Vero 细胞和正常 Vero 细胞

附 录 D

(资料性)

荧光抗体、病毒、阳性标本片、阴性标本片制备和检测

D.1 荧光抗体(FA)制备

将高免血清与等体积的 33% 饱和度硫酸铵盐析 3 次,沉淀用 PBS 溶解成原体积的 1/10,透析过夜,过 Sephadex G50 柱,去除硫酸根离子和铵离子,加入终浓度为 8% 的 PEG(相对分子量为 6 000) 4℃ 过夜,12 000 r/min 4℃ 离心 30 min,弃上清,沉淀用 PBS 溶解,调整免疫球蛋白 IgG 浓度为 20 mg/mL。将 IgG 用相当于 1/90~1/100 蛋白量的异硫氰酸荧光素(FITC)在室温下标记 2 h。过 Sephadex G50 柱,去除游离荧光素,过 DEAE-32 纤维素精制。用双波长双光束分光光度计测定精制荧光抗体。按照蛋白浓度(mg/mL)= $1.45 \times OD_{280} - 0.74 \times OD_{260}$ 计算荧光抗体的蛋白浓度,蛋白浓度达 11 mg/mL~15 mg/mL。根据 OD_{495} 值查出 FITC 浓度,再按照公式(D.1)计算荧光抗体的 F/P 值。将 F/P 值在 1~2 之间的荧光抗体混合,2 倍连续稀释,利用中和试验法进行抗体效价测定(1:64 以上)。分装、置于 -20℃ 保存备用。

F/P 值按公式(D.1)计算。

$$F/P = 0.41 \times \frac{FITC(\mu g/mL)}{IgG(mg/mL)} \dots\dots\dots (D.1)$$

式中:

F —— 荧光素;

P —— 抗体蛋白。

D.2 PEDV

经电镜、间接免疫荧光法、反转录-聚合酶链式反应和测序验证确诊的适应 Vero 细胞的 PEDV 流行毒株(P5 代),滴度为 $10^{5.5}$ TCID₅₀/mL, -70℃ 保存备用。

D.3 阳性标本片制备

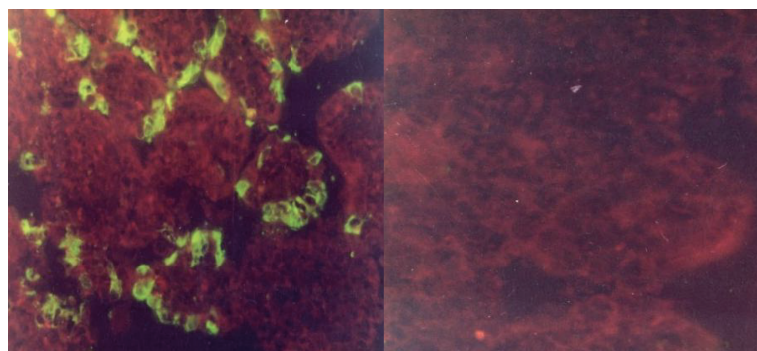
用 2 mL $10^{5.5}$ TCID₅₀/mL PEDV 细胞适应毒(P5 代)口服感染 3 d~5 d 健康仔猪,感染后 24 h~36 h,取仔猪空肠中段,制成冷冻切片(4 μm~7 μm),丙酮中固定 10 min,再置于 PBS 中浸泡 10 min~15 min,室温风干, -20℃ 保存备用。

D.4 阴性标本片制备

取 3 d~5 d PED 阴性健康仔猪空肠中段,制成冷冻切片(4 μm~7 μm),丙酮中固定 10 min,再置于 PBS 中浸泡 10 min~15 min,室温风干, -20℃ 保存备用。

D.5 PEDV 感染猪和健康猪空肠直接免疫荧光法检测参照图

PEDV 感染猪空肠在胞浆中能见到特异性绿色荧光,而健康猪空肠见不到特异性绿色荧光,如图 D.1 所示。



a) PEDV感染猪空肠 (×100)

b) 健康猪空肠 (×200)

图 D.1 PEDV 感染猪和健康猪空肠直接免疫荧光法检测图

附 录 E

(资料性)

间接免疫荧光法阳性血清、阴性血清和检测参照图

E.1 PEDV 阳性猪血清

4 周龄~6 周龄健康阴性猪(中和抗体效价低于 1:2),经后海穴接种猪流行性腹泻病毒 CV777 弱毒株,接种剂量 1ml(含毒 $10^{4.0}$ TCID₅₀)/头;间隔 2 周,用相同途径、相同剂量进行二免;间隔 2 周,用相同途径、相同剂量进行三免。三免后每周采血,测定猪流行性腹泻病毒中和抗体效价。当中和抗体效价不低于 1:32 时,前腔静脉采血,待血液凝固后,置于 37℃ 2 h,再置于 2℃~8℃ 1 h,将析出的血清转移到离心瓶中,以 2 000 r/min 离心 5 min,分离血清,2 倍连续稀释,中和抗体效价测定(1:1 024 以上)。分装、置于-20℃ 以下保存备用。

E.2 PEDV 阴性猪血清

4 周龄~6 周龄健康的 PED 阴性猪(中和抗体效价低于 1:2),经前腔静脉采血,待血液凝固后,置于 37℃ 2 h,再置于 2℃~8℃ 1 h,将析出的血清转移到离心瓶中,以 2 000 r/min 离心 5 min,分离血清。分装、置-20℃ 以下保存。

E.3 PEDV 感染 Vero 细胞和正常 Vero 细胞间接免疫荧光法检测参照图

PEDV 感染 Vero 细胞胞浆中有特异性绿色荧光,而正常 Vero 细胞胞浆无特异性绿色荧光,如图 E.1 所示。

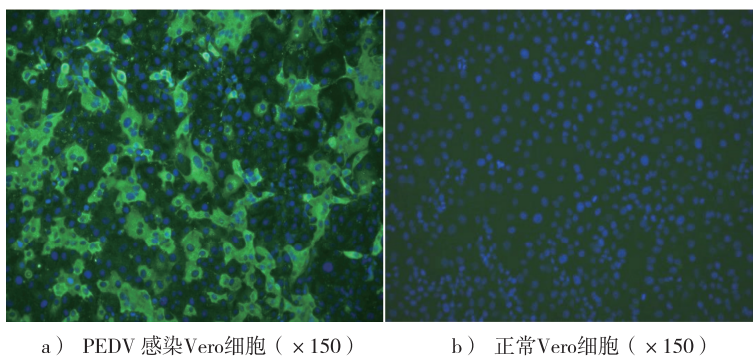


图 E.1 PEDV 感染 Vero 细胞和正常 Vero 细胞间接免疫荧光法检测图

附 录 F

(资料性)

猪抗 PEDV-IgG、抗 PEDV-IgG-HRP、阳性抗原和阴性抗原制备

F.1 猪抗 PEDV-IgG 制备

以 33% 饱和度硫酸铵溶液采取盐析法纯化提取 PEDV 阳性猪血清(中和抗体效价 1 : 512 以上)中的 IgG,即高免血清与等体积的硫酸铵溶液混合均匀,盐析 3 次,沉淀用 PBS 溶解成原体积的 1/10,透析过夜,过 Sephadex G50 柱,去除硫酸根离子和铵离子,加入终浓度为 8% 的 PEG(相对分子量为 6 000)4 ℃ 过夜,12 000 r/min 4 ℃ 离心 30 min,弃上清,沉淀用 PBS 溶解,调整蛋白浓度为 20 mg/mL,分装,于 -20 ℃ 保存备用。

F.2 猪抗 PEDV-IgG-HRP 制备

称取 HRP 25 mg 溶于 1.25% 戊二醛溶液中,于室温静置过夜;反应后的酶溶液经 Sephadex G25 柱,用生理盐水洗脱,收集棕色流出液;将 F.1 制备的猪抗 PEDV-IgG 12.5 mg 用生理盐水稀释至 5 mL,搅拌下逐滴加入酶溶液中;加 1 mol/L pH 9.5 碳酸钠缓冲液 0.25 mL,继续搅拌 3 h,加 0.2 mol/L 赖氨酸 0.25 mL,混匀后,置于室温 2 h。在搅拌下逐滴加入等体积 33% 饱和度硫酸铵,置 4 ℃ 1 h,3 000 r/min 离心 30 min,弃上清,沉淀溶于少量 PBS 中,装入透析袋中透析,去除铵离子,10 000 r/min 离心 30 min 去除沉淀,上清液即为猪抗 PEDV-IgG-HRP,分装,于 -20 ℃ 保存备用。

F.3 阳性抗原制备

PEDV CV777 毒株接种于生长 3 d 的 Vero 细胞单层上,加入含终浓度 10 μg/mL 胰酶的无血清培养液培养。当 CPE 达 90%~95% 时,收获细胞及培养液,反复冻融 3 次,4 ℃、3 000 r/min 离心 20 min,收集上清。每 30 mL 上清加 2 mL~3 mL 40% 蔗糖,4 ℃、25 000 r/min 离心 2 h,弃上清,沉淀用 2 mL TNE 缓冲液重悬;4 ℃、25 000 r/min 离心 1.5 h,弃上清,沉淀用 1 mL PBS(pH 7.4)重悬,调抗原浓度为 2 mg/mL,分装,于 -20 ℃ 保存备用。

F.4 阴性抗原制备

生长 3 d 的 Vero 细胞单层,加入含终浓度 10 μg/mL 胰酶、无血清的培养液培养,2 d 后收获细胞及培养液,反复冻融 3 次,4 ℃、3 000 r/min 离心 20 min,收集上清,分装,于 -20 ℃ 保存备用。

附 录 G

(资料性)

反转录-聚合酶链式反应溶液配制(试剂均为分析纯)

G.1 1×TAE 电泳缓冲液

称取三羟甲基氨基甲烷(Tris 碱)242 g, 乙二胺四乙酸二钠(Na_2EDTA)37.2 g, 加入去离子水 800 mL, 充分搅拌溶解, 加入 57.1 mL 的醋酸, 充分搅拌, 加去离子水定容至 1 L, 配制成 50×TAE 电泳缓冲液, 室温保存。

用去离子水将 50×TAE 电泳缓冲液 50 倍稀释, 配制成 1×TAE 电泳缓冲液。

G.2 电泳加样缓冲液 (6×)

称取乙二胺四乙酸(EDTA)4.4 g, 溴酚蓝 0.25 g, 二甲苯蓝 FF 0.25 g, 加入去离子水 200 mL, 加热搅拌充分溶解, 加入 180 mL 甘油后, 用 2 mol/L 氢氧化钠调节 pH 至 7.0, 用去离子水定容至 500 mL, 室温保存。

附 录 H
(资料性)

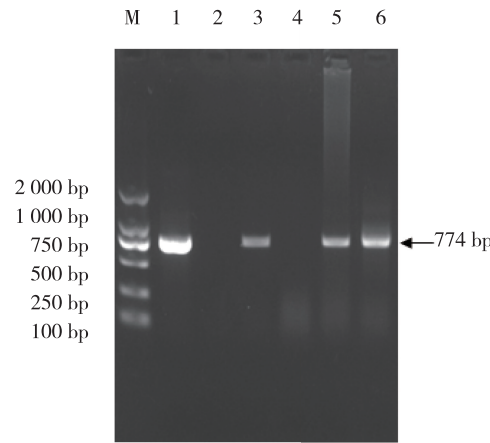
反转录-聚合酶链式反应扩增序列和检测电泳图

H. 1 扩增产物序列(CV777 株,长度 774 bp)

5'-CCTAGACTTCAACCTTACGAAGCTTTTGAAAAGGTCCACGTGCAGTGATGTTTCTTGG
ACTTTTTCAATACACGATTGACACAGTTGTCAAAGATGTCTCGAAGTCTGTCAACTTGTCTT
TGGATGCTGTCCAAGAGTTGGAGCTCAATGTAGTTCCAATTAGACAAGCTTCAAATGTGACG
GGTTTTCTTTTCACCAGTGTTTTTGTCTTACTTCTTTGCAGTGTTTAAAGCGTCTTCTTTGAGG
CGCAATTATATTATGTTGGCAGCGCGTTTTGCTGTCGTCTTTCTCTATTGCCCACTTTTATAT
TACTGTGGTGCAGTCTTTAGATGCAACTATTATTTGTTGCGCACTTATTGGCAGGCTTTGTTT
AGTCTGCTTTTACTCCTGGCGCTATAAAAATGCGCTTTTTATTATCTTTAATACTACGACAC
TTTCTTTTCTCAATGGTAAAGCAGCTTATTATGACGGCAAATCCATTGTGATTCTAGAAGGT
GGCGACCATTACATCACTTTTGGCAACTCTTTTGTGCTTTTCGTTAGTAACATTGACTTGTA
TCTAGCTATACGTGGGCGGCAAGAAGCTGACCTACATCTGTTGCGAACTGTTGAGCTTCTTG
ATGGCAAGAAGCTTTATGTCTTTTCGCAACATCAAATTGTTGGCATTACTAATGCTGCATTT
GACTCAATTCAACTAGACGAGTATGCTACAATTAGTGAATGATAATGGTCTAGTAGTTAAT
GTTATACTTTGGCTTTTTCGTACTCTTTTTCCTG-3'

H. 2 PCR 检测电泳图示

PCR 阳性对照、阴性对照电泳结果如图 H. 1 所示。



标引序号说明：
M——DNA Marker(分子量标准)DL2 000；
1——阳性对照；
2——阴性对照。

图 H. 1 PCR 检测阳性对照、阴性对照参照图

附 录 I
(资料性)

实时荧光反转录-聚合酶链式反应扩增序列和扩增曲线图

I.1 扩增序列(CV777 株,ORF3 基因,长度 108 bp)

5'-GCACTTATTGGCAGGCTTTGTTTAGTCTGCTTTTACTCCTGGCGCTATAAAarAAATGCG
CTTTTTATTATCTTTAATACTACGACACTTTCTTTTCTCAATGG-3'

I.2 实时荧光反转录-聚合酶链式反应图示

扩增曲线如图 I.1 所示。

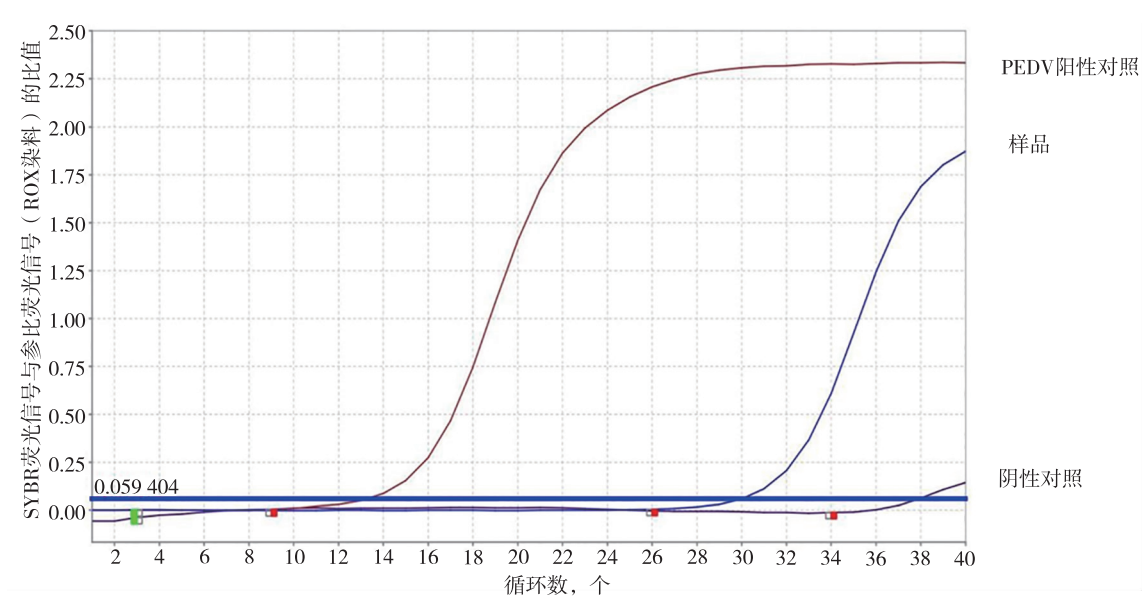


图 I.1 猪流行性腹泻病毒实时荧光反转录-聚合酶链式反应扩增图

附 录 J

(资料性)

猪流行性腹泻病毒重组 N 蛋白的表达与纯化

J.1 主要材料和试剂

猪流行性腹泻病毒 CV777 株为中国农业科学院哈尔滨兽医研究所分离培养保存,大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 和 BL21(DE3)、pGEX-6p-1 载体、RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、PCR 试剂盒、胶回收试剂盒、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、质粒提取试剂盒、培养基、琼脂糖、蛋白纯化试剂盒、蛋白定量试剂盒、DNA marker、蛋白 marker 均为商品化试剂。

J.2 引物序列

上游引物:5'-GCGGATCCATGGCTTCTGTCAGCTTT-3';

下游引物:5'-GCCTCGAGTTAATTTCTGTATCGAAG-3'。

J.3 方法

J.3.1 重组 N 蛋白原核表达载体的构建

利用 RNA 提取试剂盒提取病毒 RNA,并反转录成 cDNA。用上下游引物扩增 N 基因,琼脂糖凝胶电泳验证并纯化回收相应的扩增片段,片段大小为 1 342 bp。N 基因纯化产物和原核表达载体 pGEX-6p-1 分别用限制性内切酶 *Bam* H I 和 *Xho* I 在 37 ℃ 双酶切 2 h。胶回收目的基因 N 和 pGEX-6p-1 载体片段,用 T4 DNA 连接酶 4 ℃ 连接过夜。连接产物转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α ,筛选获得阳性重组质粒,命名为 pGEX-6p-1-PEDV-N。重组质粒转化大肠杆菌感受态细胞 BL21(DE3),获得阳性菌株。

J.3.2 重组 N 蛋白的表达与纯化

阳性菌液按 1 : 100 体积比接种于 LB 液体培养基中,置于 37 ℃、220 r/min 培养。当菌液 OD_{600 nm} 值达 0.6~0.8 时,向培养基中加入终浓度为 1 mmol/mL 的 IPTG,置于 16 ℃、150 r/min 培养 16 h。取诱导后菌液,以 8 000 r/min 离心 10 min,收集菌体沉淀,用 PBS 洗菌体沉淀 3 次,以 8 000 r/min 离心 10 min,再用 1/10 菌液体积的 PBS 重悬菌体沉淀,在 150 W 功率的超声波作用下冰浴裂解,有效时间为 10 min,工作时间为 5 s,间隔 5 s。将超声裂解物置于 4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min,收集上清液。上清液经 GST Bind 树脂纯化,分步洗脱并收集目的蛋白洗脱液,即为纯化的目的蛋白。

J.3.3 重组 N 蛋白的浓度及纯度测定

分别取 1 μ L、2.5 μ L 和 5 μ L 纯化的重组 N 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,用凝胶成像仪成像并用软件 BandScan 5.0 分析蛋白浓度,蛋白纯度应不低于 90%。用商品化的蛋白定量试剂盒(BCA 法)按其说明书对纯化的重组 N 蛋白进行蛋白浓度测定。纯化后,重组 N 蛋白浓度应不低于 200 μ g/mL。