



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1558—2017
代替 SN/T 1558—2005

禽脑脊髓炎检疫技术规范

Quarantine protocol for avian encephalomyelitis

2017-05-12 发布

2017-12-01 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国家质量监督检验检疫总局

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 1558—2005《禽脑脊髓炎琼脂免疫扩散试验操作规程》。

本标准与 SN/T 1558—2005 相比,主要技术变化如下:

- 增加了禽脑脊髓炎病毒分离;
- 增加了反转录-聚合酶链式反应;
- 增加了间接免疫荧光试验;
- 增加了酶联免疫吸附试验。

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、深圳市检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人:杨俊兴、孙洁、廖立珊、张彩虹、刘建利、陶虹、林彦星、吕建强、曹琛福、卢体康、花群义、秦智锋。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- SN/T 1558—2005。

禽脑脊髓炎检疫技术规范

1 范围

本标准规定了禽脑脊髓炎的病毒分离与鉴定、反转录-聚合酶链式反应、间接免疫荧光试验、酶联免疫吸附试验、琼脂扩散试验的检测技术。

本标准适用于禽脑脊髓炎的检疫。

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。

SN/T 2123 出入境动物检疫实验样品采集、运输和保存规范

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

AE:禽脑脊髓炎(参见附录 A)(Avian encephalomyelitis)

AEV:禽脑脊髓炎病毒(Avian encephalomyelitis virus)

AGID:琼脂扩散试验(Agar gel immunodiffusion test)

BSA:牛血清白蛋白(Bovine serum albumin)

CEF:鸡胚成纤维细胞(Chickenembryo fibroblast)

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

PBS:磷酸缓冲液(Phosphate buffer saline)

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

4 病毒分离与鉴定

4.1 设备、器材和试剂

4.1.1 主要设备和器材:高压灭菌锅、冰箱、生物安全柜、离心机、无菌剪刀、镊子、平皿、烧杯、玻璃瓶、组织研磨器、注射器等。

4.1.2 材料:SPF 种蛋、SPF 雏鸡。

4.1.3 主要试剂:生理盐水、青霉素(10 000 IU/mL)、链霉素(10 000 μ g/mL)。

4.2 样品的采集、保存和运输

无菌取雏鸡脑组织后,宜立即处理(见 4.3),若暂时不能处理,可于 -70°C 冰箱中保存。样品的保存和运送按 SN/T 2123 进行操作。

4.3 样品的处理

将组织样品无菌称量、研磨,反复冻融 3 次,用无菌生理盐水溶液作 1:5(W/V)稀释制成悬液,并

加青霉素(终浓度为 100 IU/mL)和链霉素(100 μg/mL)。样品经 4 000 r/min 离心 10 min,取上清液,冻存、备用。

4.4 鸡胚接种

取 4.3 中上清液,以 0.2 mL/胚,经卵黄囊无菌接种 6 日龄 SPF 鸡胚,每份样本至少接种 5 枚鸡胚,同时设未接种病料的空白对照组和接种 0.2 mL SPF 鸡脑组织处理液的阴性对照组。于 37 ℃ 孵化箱内孵育至 16 日龄。每隔 12 h 观察鸡胚死亡情况,并记录。收集 24 h 后死亡和仍存活的鸡胚,无菌吸取胚液(尿囊液和羊水),然后观察胚体发育情况;检查胚体、胚脑病变。若鸡胚有病变或鸡胚死亡,取胚脑、胃、肠、胰腺称量、研磨,以胚液作 1 : 5 稀释,加入青霉素(终浓度为 100 IU/mL)和链霉素(100 μg/mL),4 000 r/min 离心 10 min,制成鸡胚组织病毒液,即为第 1 代病毒液(AEV E1)。取 AEV E1 按照本条上述方法再接种 6 日龄 SPF 鸡胚卵黄囊,传代 2 代,收集胚液,即可作为病毒鉴定用的病毒液。若鸡胚无病变,盲传至第 5 代。与健康对照组鸡胚相比,发病鸡胚病变为:胚体活力减弱、发育不良和肌肉萎缩(胚体重减轻)、腿细、爪曲或强直,脑萎缩,皮下、脑、胃肠水肿、出血等。

可进一步通过 RT-PCR 和/或间接免疫荧光试验进行病毒鉴定(见第 5 章、第 6 章)。

5 反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)

5.1 设备、器材和试剂

5.1.1 主要设备和器材:PCR 仪、离心机、电流仪、电泳槽、凝胶成像系统、-20 ℃ 冰箱。

5.1.2 主要试剂:Trizol、三氯甲烷、异戊醇、无水乙醇、PCR 反应缓冲液、*Taq* DNA 聚合酶、dNTP、琼脂糖、DNA marker。

注:核酸提取可使用等效的商品化病毒核酸提取试剂盒。

5.1.3 对照样品:灭活 AEV 作为阳性对照,由指定单位提供。SPF 鸡胚尿囊液作为阴性对照。

5.2 引物和序列

P1:5'-CTTATGCTGGCCCTGATCGT-3';

P2:5'-CCACAAACCTAGCCAAGGTG-3';

扩增目的片段为 612 bp。

5.3 核酸提取

5.3.1 取 250 μL 处理后的样品置于 1.5 mL 离心管中,作好标记。同时设立阳性样品、阴性样品对照。加入 3 倍体积的 Trizol,震荡混合 20 s,静置 5 min。

5.3.2 加入 200 μL 三氯甲烷,震荡混合 20 s,静置 5 min;4 ℃ 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液置另一个标记好的 1.5 mL 离心管中,加入等体积异丙醇,-20 ℃ 静置 15 min。

5.3.3 4 ℃ 12 000 r/min 离心 15 min,弃去上清,加入 1 mL75%乙醇。

5.3.4 4 ℃ 12 000 r/min 离心 15 min,小心弃去乙醇,将离心管倒置于滤纸上,自然晾干,加入 20 μL DEPC 水溶解沉淀,即为 RNA 模板,可立即用于 RT-PCR 检测,或放-20 ℃ 保存。

5.4 RT-PCR 检测

5.4.1 反应体系

10×RT-PCR 缓冲液	2.5 μL
P1(20 μmol/L)	1 μL

P2(20 μmol/L)	1 μL
dNTP(各 10 mmol/L)	2 μL
RNA 模板	5 μL
反转录酶(5 U/μL)	0.5 μL
Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)	0.5 μL
无 RNA 酶水	12.5 μL
总体积	25 μL

5.4.2 反应程序

反应条件:42 ℃ 30 min;95 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,55 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min,共 35 个循环。72 ℃ 延伸 10 min。

5.5 琼脂糖凝胶电泳分析

用 1×TBE 电泳缓冲液配制 2%琼脂糖凝胶平板(见附录 B),将平板放入水平电泳槽,使电泳缓冲液刚好淹没胶面。取 8 μL PCR 产物和 2 μL 样品缓冲液混匀后加入样品孔,同时加入 DNA 分子量标准物质(DNA marker)。调节电压为约 5 V/cm,电泳约 25 min。在紫外灯下或凝胶电泳分析仪观察是否出现大小约为 612 bp 的基因片段(核酸序列参考附录 C)。若出现相应大小的条带,则判为 AEV 阳性,否则判为 AEV 阴性。

6 间接免疫荧光试验

6.1 设备、材料和试剂

- 6.1.1 主要设备:荧光显微镜,冰冻切片机。
- 6.1.2 主要试剂:FITC 标记兔抗鸡 IgG 抗体、标准阳性血清、标准阴性血清(SPF 鸡血清)、冷冻固定剂、无水乙醇和丙酮。
- 6.1.3 组织样品:发病雏鸡脑组织样品(阳性对照)、健康雏鸡脑组织样品(阴性对照)和待检脑组织样品。

6.2 操作方法

6.2.1 冰冻组织切片制备

取 AE 发病鸡脑组织样品、SPF 鸡脑组织样品和待检禽脑组织样品,分别覆以冷冻固定剂,−15 ℃~−18 ℃固定过夜。次日取出,经冰冻切片机切片,将组织切片置载玻片上,用−20 ℃预冷的丙酮:乙醇(3:2)固定液室温固定 5 min~10 min。

6.2.2 间接免疫荧光检测

将固定好的组织切片,PBS 洗 3 次,分别加上标准阳性血清和标准阴性血清 100 μL/片,于 37 ℃温度孵育 30 min 后用 PBS 洗涤 3 次,加入 FITC 标记兔抗鸡 IgG 抗体,置 37 ℃孵育 30 min,经 PBS 洗涤 3 次后在荧光显微镜下观察。

6.2.3 结果判定

阳性对照脑组织切片与标准阳性血清作用,出现明亮绿色荧光,而与标准阴性血清作用以及 SPF 鸡脑组织切片与阳性血清作用均无亮绿色荧光,则对照成立。判定结果时,若被检组织的细胞浆中出现

绿色荧光,判为阳性,否则判为阴性。

7 酶联免疫吸附试验

7.1 设备、材料和试剂

7.1.1 主要设备和材料:酶标仪、37℃恒温箱、4℃冰箱、ELISA洗板机、超声波破碎仪、酶标板。

注:也可使用等效的商品化间接ELISA试剂盒检测AEV抗体。

7.1.2 包被抗原:为纯化的AEV抗原。按附录D制备并培养鸡胚成纤维细胞(CEF),待CEF生长至单层,弃去营养液,用无菌PBS洗2次~3次,按培养液原体积的1/10接种AEV,37℃吸附1h。弃去病毒液,加入维持液(含2%犊牛血清的MEM),于CO₂培养箱37℃培养6d~7d后,冻融3次~5次,作为毒种,依次传代至第5代。将第5代收获细胞毒经超声破碎仪处理,10 000 r/min离心60 min,将上清转移至另一离心管中,45 000 r/min离心150 min,去上清,沉淀物用适量无菌PBS溶液悬浮,经超声破碎仪处理,用分光光度计测定提纯物蛋白质浓度,纯化后抗原蛋白浓度应≥1.0 g/L。

7.1.3 阳性血清:鸡抗AEV阳性血清,由指定单位提供。

7.1.4 阴性血清:SPF鸡血清。

7.1.5 待检血清:按常规方法采集鸡全血约1 mL并分离血清,将血清置于4℃保存待检或-70℃长期保存。

7.1.6 酶标记抗体:辣根过氧化物酶标记的兔抗鸡IgG。

7.1.7 ELISA包被液、封闭液、稀释液、洗涤液(PBST)、底物液、终止液见附录B。

7.2 试验操作

7.2.1 包被:用包被液稀释AEV抗原至终浓度为10 mg/L,包被96孔ELISA板,50 μL/孔,置4℃冰箱过夜。

7.2.2 封闭:弃去包被液,加入1% BSA溶液,200 μL/孔,37℃放置1 h,弃去封闭液,用PBST洗3遍。

7.2.3 加样:每份样品(包括阴性对照、阳性对照样品和待检样品)做2个平行检测,50 μL/孔,轻轻敲打酶标板边缘,使孔内反应液均匀铺满孔底。置于37℃反应1 h,弃去反应物,用PBST洗3遍。

7.2.4 加入用稀释液稀释的酶标记抗体(1:3 000或按相关说明书进行稀释),50 μL/孔,轻轻敲打酶标板边缘,使孔内反应液均匀铺满孔底。置于37℃反应30 min,弃去反应物,用PBST洗3遍。

7.2.5 加入底物液,50 μL/孔,轻轻敲打酶标板边缘,使孔内反应液均匀铺满孔底。室温避光反应20 min。

7.2.6 加入终止液,50 μL/孔。

7.2.7 用酶标仪在450 nm下读取OD值。

7.3 结果判定

7.3.1 S/P值的计算见式(1):

$$S/P = \frac{\text{待检样品 OD 平均值} - \text{阴性对照 OD 平均值}}{\text{阳性对照 OD 平均值} - \text{阴性对照 OD 平均值}} \dots\dots\dots (1)$$

7.3.2 样品S/P≥0.2,为AEV抗体阳性;样品S/P<0.2,为AEV抗体阴性。

8 琼脂扩散试验

8.1 设备、器材和试剂

8.1.1 主要设备

37℃恒温箱、冰箱。

8.1.2 主要器材

8.1.2.1 平皿：直径为 90 mm。

8.1.2.2 微量加样器。

8.1.2.3 塑料吸头。

8.1.2.4 打孔器：内径 4.0 mm，孔间距 3.0 mm，7 孔梅花样金属打孔器。

8.1.3 试剂

8.1.3.1 脑脊髓炎琼脂扩散试验抗原和标准阳性血清，由指定单位提供。

8.1.3.2 被检血清：按常规方法采集鸡全血约 1 mL 并分离血清，将血清置于 4℃ 保存待检或 -70℃ 长期保存。

8.1.3.3 琼脂糖。

8.2 操作步骤

8.2.1 琼脂板制备

称取琼脂糖 1.0 g，加 0.01 mol/L PBS(pH7.2)至 100 mL。加热熔化后，加入 8.0 g 氯化钠，充分溶解后，加 1.0 mL 1% 硫柳汞溶液(终浓度为 0.01%)。冷却至 45℃~50℃，将洁净干燥、直径为 90 mm 的灭菌平皿，放置于水平平台上，每个平皿加 18 mL，厚度约为 3.0 mm。凝固后盖严，把平皿倒置放入 4℃ 冰箱中保存备用。

8.2.2 打孔

反应孔现用现打。从冰箱内取出琼脂板，用 7 孔一组的梅花形打孔器进行打孔(中间 1 孔，外周 6 孔)(见图 1)，孔径 4.00 mm，孔距 3.0 mm。将孔中的琼脂糖轻轻挑出或吸出，勿伤及边缘或使琼脂层脱离玻璃。

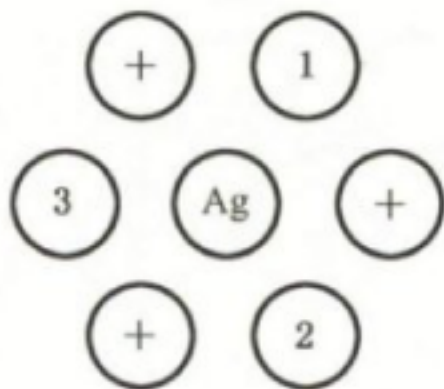


图 1 梅花形 7 孔图

8.2.3 封底

在酒精灯火焰上通过 4 次~6 次加热平皿背面，使底部琼脂稍微熔化。

8.2.4 加样

结合上列图示,用微量加样器吸取抗原溶液滴入中央孔,标“+”的三孔加标准阳性血清,1、2、3 孔加被检血清,每孔均需加满,但不能溢出。每加一个被检样品应换一个吸头。

8.2.5 反应

加样完毕,室温静置 10 min,放入保湿盒内置 22 ℃~26 ℃ 反应,分别在 24 h、48 h 和 72 h 观察并记录结果。

8.3 结果判定

8.3.1 判定前提

将琼脂板置日光灯或侧强光下观察,在抗原孔与标准阳性血清孔之间出现一条清晰、致密的沉淀线,抗原孔与阴性血清孔之间不出现沉淀线,说明对照成立,可进行结果判定。

8.3.2 阳性

抗原孔与被检血清孔之间形成的沉淀线与阳性对照血清形成的沉淀线弯曲环联,判为阳性(见图 2)。

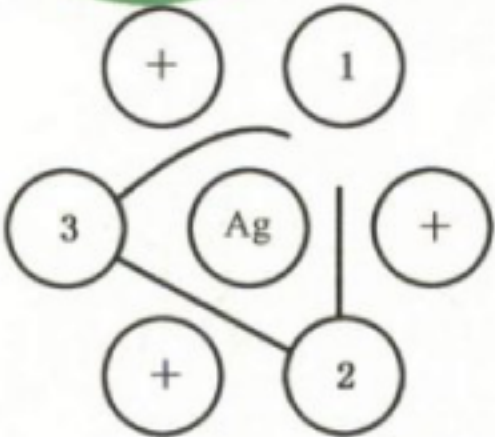


注：标“+”为阳性血清,1、2、3 孔被检血清呈阳性。

图 2 被检血清阳性示意图

8.3.3 可疑

若抗原孔与被检血清孔间虽不出现沉淀线,但抗原与标准阳性血清孔间的沉淀线在被检血清孔位置微向内侧弯曲者(见图 3 中的 1 号孔),则被检血清判为可疑反应。对该份血清应复检,仍为可疑则判为阳性反应。



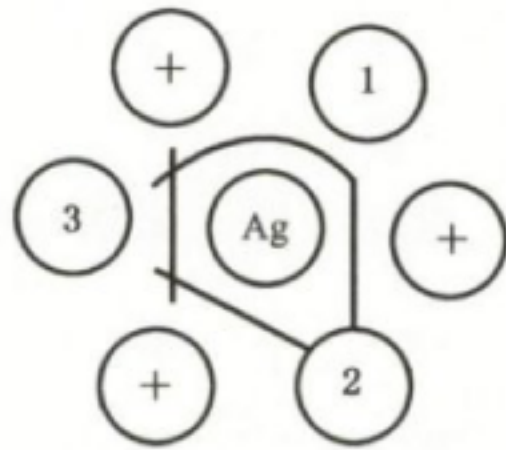
注：标“+”为阳性血清,1 孔被检血清为可疑,2、3 孔被检血清呈阴性。

图 3 被检血清呈可疑结果示意图

8.3.4 非特异性反应

若抗原孔、被检血清孔之间的沉淀线与抗原孔、标准阳性血清孔之间的沉淀线交叉,则判为非特异

性反应,应重做。若仍出现非特异性反应则判为阴性(如图 4 所示第 3 孔)。

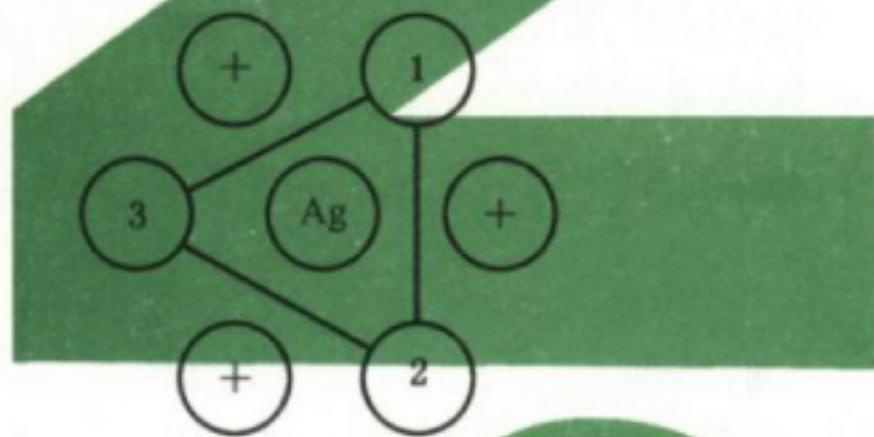


注：标“+”为阳性血清,1 孔被检血清为阳性,2 孔被检血清为阴性,3 孔被检血清呈非特异性反应。

图 4 被检血清呈非特异性反应示意图

8.3.5 阴性

抗原孔与被检血清孔之间无沉淀线,抗原孔与标准阳性血清孔间沉淀线直伸延到被检血清孔边缘无弯曲者,则判为阴性(见图 5)。



注：标“+”为阳性血清,1、2、3 孔被检血清呈阴性

图 5 被检血清呈阴性示意图

附 录 A
(资料性附录)
禽脑脊髓炎概述

禽脑脊髓炎(Avian encephalomyelitis, AE)是由细小 RNA 病毒科(Picornaviridae)、肠病毒属(Enterovirus)的禽脑脊髓炎病毒(Avian encephalomyelitis virus, AEV)引起的,以主侵幼鸡中枢神经系统引起非化脓性脑炎为主要病理特征的一种病毒性传染病。AEV 为 RNA 病毒,属于微 RNA 病毒科肠道病毒属。禽脑脊髓炎呈世界性分布,对养鸡业特别是种鸡饲养业造成了极大危害。该病 1930 年首先在美国被发现,现已遍及世界大多数国家。在我国,自 1980 年以来,先后在广东、江苏、辽宁、黑龙江、河北、内蒙古、福建、上海等省市区有发生 AE 的报道。

流行病学

除鸡易感 AEV 外,雉鸡、鹌鹑、火鸡和山鸡也可自然感染。无本病史和未经免疫的鸡群一旦感染,雏鸡发病率通常为 40%~60%、死亡率为 10%~80%或更高。不同日龄的鸡一年四季均可感染。随日龄的增长,鸡对 AEV 的抵抗力不断增强。感染鸡的种蛋可以引起后代鸡胚和雏鸡发病;同时,病鸡的分泌物和排泄物可污染环境、饲料和饮水,引起与其接触的易感鸡发病。自然情况下,4 周龄以内的雏鸡(幼禽)对 AEV 最易感;人工感染 1 日龄雏鸡脑内接种 AEV 强毒 5 d~7 d 后可发病;经胚胎感染的雏鸡出壳后潜伏期 1 d~7 d,口服感染或自然接触一般 9 d~11 d 后发病。

临床症状

自然感染和人工感染雏鸡的临床症状基本一致,初期精神沉郁、嗜睡、易惊、斜视、呈半蹲姿势、头颈偏向一侧、饮水困难,双腿紧缩、叉开或爪蜷缩,以后可出现站立不稳、进行性运动失调、头颈快速震颤等症状,甚者常因瘫痪、衰竭而死亡。成年鸡感染后一般不出现明显症状,有时仅见轻微腹泻,产蛋率下降 10%~40%和种蛋孵化率降低。

病理变化

典型病变为非化脓性脑炎,镜下可见神经元发生中央染色质溶解和逐渐性坏死,小胶质细胞增生,血管周围管套现象。人工感染病鸡进行病理学研究发现:肉眼可见脑组织表面有充血淤血,或有针尖大出血点和灰白色小病灶。镜下可见毛细血管增多、充血、水肿、管套形成,小血管外围出现围管性细胞浸润,浸润的细胞以淋巴细胞为主,也有少量浆细胞和巨噬细胞,这些细胞少则 1 层~2 层或散在,多则几层、十几层,密集排列形成管套,严重时可压迫血管使之狭窄或闭塞;神经细胞变性和中央染色质溶解,变性的神经细胞肿大、淡染或浓缩,有的呈现中央染色质溶解现象。此外,外周神经和其他实质器官也有一定病变,并有淋巴细胞增生。

附 录 B
(规范性附录)
溶液配方

B.1 0.01 mol/LPBS(pH 7.2)的配制

磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2.9 g
磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)	0.3 g
氯化钠(NaCl)	8.0 g
加蒸馏水至	1 000 mL
用氢氧化钠(NaOH)或盐酸(HCl)调 pH 至 7.2,灭菌或过滤。	

B.2 ELISA 包被液(pH 9.6 碳酸盐缓冲液)

碳酸氢钠(NaHCO_3)	2.93 g
碳酸钠(Na_2CO_3)	1.59 g
蒸馏水	1 000 mL
溶解后置于 4 ℃ 冰箱保存,请在一周内使用。	

B.3 洗涤液(含 0.1% Tween-20 pH 7.4 PBS,PBST)

氯化钠(NaCl)	8 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.2 g
磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	2.9 g
氯化钾(KCl)	0.2 g
Tween-20	1 mL
蒸馏水	1 000 mL
溶解后置于 4 ℃ 冰箱备用。	

B.4 封闭液

3% BSA 溶液:取 3 g BSA 粉,加入 100 mL 蒸馏水,混匀,置于 4 ℃ 冰箱备用。

B.5 稀释液

含有 1%BSA 的 PBST,用于血清样品、酶标记抗体的稀释。

B.6 底物液

B.6.1 乙酸-柠檬酸缓冲液(pH 6.0):

A 液:乙酸钠溶液

乙酸钠	1.64 g
双蒸水	200 mL
B 液:柠檬酸缓冲液	
柠檬酸	2.1 g
蒸馏水	100 mL

配制:取 B 液约 2 mL 至 A 液中,调 pH 值 6.0,置于 4 ℃ 冰箱保存备用。

B.6.2 TMB 溶液:

TMB	0.35 g
甲醇	100 mL

加温溶解后于暗盒中室温保存。

B.6.3 底物工作液(现用现配):

乙酸-柠檬酸缓冲液(pH 6.0)	9.7 mL
TMB 溶液	0.3 mL
H ₂ O ₂	7 μL

B.6.4 可使用等效商品化底物溶液。

B.7 终止液(2 mol/L H₂SO₄)

浓硫酸(H ₂ SO ₄)	22.2 mL
蒸馏水	177.8 mL

B.8 5×TBE 电泳缓冲液

Tris 碱	54.0 g
硼酸	27.5 g
0.5 mol/L EDTA 溶液(pH 8.0)	20 mL

蒸馏水定容至 1 000 mL,充分溶解,4 ℃ 保存。

B.9 2%琼脂糖凝胶

在 200 mL 三角烧瓶中加入琼脂糖 2 g;1×TBE 缓冲液 100 mL。微波炉中使之完全溶解,加入 2 μL浓度为 10 mg/mL 溴化乙锭溶液(或等效商品化 DNA 染料)2 μL 充分摇匀,备用;待琼脂糖冷却至 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,将凝胶托盘放入电泳槽,加入 1×TBE 电泳缓冲液使之高出凝胶 2 mm~3 mm。

B.10 硼酸缓冲液(pH 8.6)

四硼酸钠	8.8 g
硼酸	4.65 g
蒸馏水加至 1 000 mL。	

附 录 C
(资料性附录)
相关基因片段序列

RT-PCR 扩增 AEV VP1 基因片段参考序列(612 bp):

CTTATGCTGGCCCTGATCGTACTGCAGTAGTTGGCGGAGGATTTCTGACAACGGTAGACCA
GAGTTCAGTTAGTACGGCTACAATGGGAAGTTTACAGGATGTACAGTACAGAACTGCAGT
CGACATCCCTGGTTCTAGAGTGACACAAGGTGAGAGGTTTTTCCTTATTGATCAGCGTGAG
TGGAACCTCAACACAGAGTGAATGGCAGTTATTGGGCAAGATTGACATAGTAAAAGAGTTG
CTTGATCAGTCATATGCTGTTGATGGCCTTTTGAAATACCATTCTTATGCGAGGTTTGGCT
TGGACGTCATTGTTTCAGATTAATCCAACATCATTCCAGGCAGGGGGTCTCATAGCAGCCCT
TGTACCTTATGACCAGGTTGATATTGAATCAATTGCTGCCATGACTACTTATTGCCATGGC
AAGTTGAATTGCAACATAAACAACGTTGTAAGAATGAAGGTGCCATACATATACAGTCGA
GGTTGTTACAACCTTAGGAACTCAGCATACTCCATTTGGATGCTTGTAATAAGAGTGTGG
TCACAGCTGCAGTTGGGATCCGGCACTTCAACACAGATTACTGTCACCACCTTGGCTAGGT
TTGTGG

附 录 D
(规范性附录)

鸡胚成纤维细胞制备及培养

鸡胚成纤维细胞制作方法：

选择 9 日龄~10 日龄发育良好的 SPF 鸡胚，依次用碘酒和 75%酒精消毒蛋壳气室部位，剥去气室部位蛋壳，无菌取出鸡胚，去头、四肢和内脏，放入无菌玻璃器皿内，用 DMEM 液洗涤胚体。用灭菌手术剪将胚体剪成 1 mm³~2 mm³ 大小的组织块，再用 DMEM 液洗 2 次~3 次。加入适量 0.25%胰酶溶液（每个鸡胚约加 1 mL），于 37 ℃水浴中消化 10 min~15 min，每隔 2 min 振荡 1 次。加入 1 mL 胎牛血清，终止消化反应。用吸管反复吹打数次，使细胞团块充分分散，用无菌纱布过滤，收集滤液，低速离心（500 r/min~1 000 r/min）离心 5 min，去上清，加入适量含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液。取出少许细胞液进行细胞计数，用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液将细胞密度调整至 10⁶ 个/mL，分装于细胞瓶中，置于含 5%CO₂ 的 37 ℃培养箱中进行培养。
