



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3464—2012

鸭病毒性肝炎 I 型检疫技术规范

Quarantine protocol for duck viral hepatitis serotype I

2012-12-12 发布

2013-07-01 实施

中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准修改采用了 OIE 陆生动物诊断试验和疫苗手册 2010 版 2.3.8.B 中的诊断技术部分内容，涵盖了病毒分离与鉴定、PCR 方法及中和试验，增加了荧光 PCR 方法。

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：中华人民共和国吉林出入境检验检疫局、中华人民共和国江苏出入境检验检疫局、中华人民共和国惠州出入境检验检疫局、吉林农业大学。

本标准主要起草人：王伟利、宋战昀、姜焱、李影、孟庆峰、肖成蕊、周宇、孟日增、刘阳、刘和平、吴连鹏、石建平、王振国。

鸭病毒性肝炎 I 型检疫技术规范

1 范围

本标准规定了鸭病毒性肝炎 I 型检疫技术规范,包括病毒分离与鉴定、PCR 及荧光 PCR 方法、血清中和试验等诊断技术。

本标准适用于进出境鸭病毒性肝炎 I 型的检疫、疫情监测和流行病学调查。

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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DVH:鸭病毒性肝炎

DHV I:鸭病毒性肝炎 I 型病毒

DEL:鸭胚肝细胞

DEK:鸭胚肾细胞

FCS:胎牛血清

4 临床诊断

4.1 发病症状

鸭病毒性肝炎 I 型(duck viral hepatitis Serotype I, DVH I)是由鸭病毒性肝炎病毒 I 型(DHV I)引起的雏鸭的一种急性高度致死性传染病,主要侵害 4 周龄以内的雏鸭,特别是不足 1 周龄的雏鸭最易感染,死亡率可达 90%以上。感染初期病鸭精神萎靡、缩颈、翅下垂、呆滞、共济失调;食欲减退,厌食;半天至一天后,身体失去平衡歪向一侧,发生全身性抽搐,两腿痉挛式划动。死时头向后仰,呈脚弓反张姿势。最急性病鸭,常未见任何异常,而突然抽搐痉挛死亡。病程短,可在 1 d~2 d 内死亡。一个鸭群感染 3 d~4 d 后可以全部死亡,但大多数在第二天死亡。

4.2 病理变化

剖检可见病变主要发生在肝脏,肝脏肿大、有点状或斑状出血,也有可能伴有明显的脾脏肿大、肾肿胀和肾血管充血。肝脏显微病变的特点是肝细胞广泛坏死和胆管增生,不同程度的细胞炎性反应和出血。

4.3 流行病学

该病一年四季均可发生。病鸭及隐性带毒成鸭是主要的传染源。在自然界条件下,本病只发生于

雏鸭,雏鹅亦可感染。主要是4周龄内的雏鸭发病,成鸭呈隐性感染,目前,发病日龄有增大趋势。该病多与沙门氏菌、大肠杆菌、曲霉菌、鸭疫里默氏杆菌、鸭霍乱等混合或继发感染。本病通过消化道和呼吸道感染,无垂直传播。母源抗体的高低是本病发生的主要因素,饲养管理不良,缺乏维生素和矿物质,鸭舍潮湿、拥挤,均可促使本病的发生。康复鸭仍然可从粪便中排毒,粪便对环境污染,在鸭病毒性肝炎的传播中起重要作用。

近年来临床上在较大日龄鸭群或已作免疫接种的鸭群发生本病时,病例常缺乏典型的病理变化,仅见肝脏稍肿大、淤血,表面有末梢毛细血管扩张破裂而无严重的斑点状出血,易造成误诊、漏诊,必须经过病原分离鉴定确诊。

5 病毒分离与鉴定

5.1 仪器、材料与试剂

5.1.1 仪器

生物安全柜、高速冷冻离心机、研钵、孵化箱、组织匀浆器。

5.1.2 材料

移液器(200 μL ~1 000 μL , 20 μL ~200 μL)及吸头、吸管(5 mL, 10 mL)、5 mL离心管、一次性注射器(1 mL, 5 mL)、细胞培养瓶、微孔滤膜(0.22 μm)、手术剪刀和手术镊子。

5.1.3 试剂

除特别说明以外,本标准所用试剂均为分析纯,试验用水应符合 GB/T 6682 分析实验室用水规格。

生理盐水、青霉素、链霉素、Hank's 平衡盐溶液、Hank's 无钙镁平衡盐溶液、抗菌素溶液、胰酶消化液、细胞培养液、维持液、琼脂维持液、稀释液、细胞生长液(见 A.1~A.10)、新生犊牛血清。

5.2 实验动物

1~7 日龄健康雏鸭、10~14 日龄健康鸭胚或 8~10 日龄 SPF 鸡胚、DEL 细胞(见 B.1)。

5.3 病料采集与处理

无菌采集的病鸭肝脏用灭菌生理盐水制成 20% 的匀浆,3 000 r/min 离心 30 min,取上清液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,加入抗菌素至终浓度为青霉素 2 000 IU/mL,链霉素 2 000 $\mu\text{g/mL}$,作为待检样品备用。

5.4 病毒分离试验

5.4.1 动物接种试验

取对 DHV I 型易感的 1~7 日龄雏鸭 5 只,皮下或肌肉接种上述滤液,0.2 mL/只,另设雏鸭接种生理盐水对照组。接种后分开饲养,随时观察。如果出现特征性的临床症状,并于接毒后 18 h~48 h 出现死亡,通常在 24 h 内死亡。剖检可见 DHV I 型感染的病变并能从肝脏中重新分离出病毒。

5.4.2 鸭(鸡)胚接种试验

将上清液进行系列稀释后,每个稀释度接种于 6 枚 10~14 日龄鸭胚或 6 枚 8~10 日龄鸡胚的尿囊腔内,0.2 mL/枚,另设鸭胚或鸡胚接种生理盐水对照组。鸭胚于 24 h~72 h 后死亡,鸡胚接种后 5 d~8 d 发生死亡。胚胎的眼观病变为发育阻滞,全身皮下出血,伴有腹部和后肢部的严重水肿。胚肝呈红

黄色肿胀并有坏死灶。死亡时间较长的胚胎中,尿囊液明显变绿,肝脏病变和发育阻滞会更明显。

5.4.3 细胞培养分离试验

取 14 d~17 d 的鸭胚按常规方法制作原代 DEL 细胞,于 5%CO₂ 培养箱内培养 2 d 长成单层,弃去营养液,用维持液清洗 2 次,接种待检样品,0.1 mL/10 mL,37 °C 感作 1 h,待维持液清洗 1 次后,加入适量维持液,放入 5%CO₂ 培养箱内培养,每天镜检,观察 CPE 情况。同时设维持液对照瓶。如果含有 DHV I 型病毒则能引起 CPE,且 CPE 特征为细胞变圆坏死。如果覆盖一层含 1%琼脂糖的维持液时,CPE 能形成直径为 1 mm 的蚀斑。

5.5 病毒鉴定

病毒分离物选用电镜观察、中和试验、PCR 及荧光 PCR 等方法进行鉴定,通常用以上一种或多种方法鉴定 DHV I 型。

6 反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)

6.1 仪器、材料与试剂

6.1.1 仪器

PCR 扩增仪、低温高速离心机、电泳仪、电泳槽、凝胶成像分析系统、组织匀浆器。

6.1.2 材料

可调微量移液器(200 μL~1 000 μL、20 μL~200 μL、2 μL~20 μL、0.5 μL~10 μL)、1.5 mL、0.2 mL 离心管和吸头(用 DEPC 水处理后高压灭菌备用,处理方法见附录 A.11)。

6.1.3 试剂

Trizol、三氯甲烷、异丙醇、75%乙醇、DEPC 水、反转录酶、dNTPs(每种浓度均为 10 mmol/L)、5×RT 缓冲液、RNA 抑制剂 RNasin(40 U/μL)、RNaseA(20 μg/mL)、Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)、琼脂糖(电泳级)、DNA Marker DL2000、50×Tris-冰乙酸(TAE)电泳缓冲液、溴化乙锭溶液(10 mg/mL)、1%琼脂糖凝胶(见 A.12~A.15)。

6.2 阳性对照

由指定单位提供或将 DHV I 标准毒株通过鸭胚传代培养或细胞培养,其培养物经过灭活制备而成。

6.3 阴性对照

由指定单位提供或将健康的鸭胚尿囊液,冻融 2~3 次,5 000 r/min 离心 10 min,取上清液备用。

6.4 引物

根据 GenBank 中 DHV I 的保守基因序列,设计合成一对特异性引物:上游引物 5'-ACAATGAC-CCAGCCTTAG-3',下游引物 5'-CCACTGTATCTTCCCTTC-3',使用前用 DEPC 水溶解成 25 pmol/μL,-20 °C 保存备用。

6.5 RNA 的提取

取含 DHV I 毒的鸭胚尿囊液或细胞培养液经 8 000 r/min 离心 10 min 后取上清备用;取病变肝

组织 0.5 g,按 1:10 体积比用生理盐水研磨,冻融 3 次,4℃,8 000 r/min 离心 15 min,取上清液备用。

参照 Trizol 法提取,按照试剂说明书进行。取上述样品 200 μL ,加 700 μL 的 Trizol 溶液充分振荡,加 200 μL 三氯甲烷,4℃,12 000 r/min 离心 15 min,取上清液至少 500 μL ,加异丙醇 500 μL 充分混匀,4℃,12 000 r/min 离心 15 min,弃上清,沉淀用 75% 的乙醇洗涤,4℃,12 000 r/min 离心 10 min;加 11 μL DEPC 水溶解沉淀,-20℃ 保存备用。或按照市售的 RNA 抽提试剂盒操作说明提取病毒 RNA。

6.6 PCR 检测

6.6.1 RT 反应

RT 反应采用 20 μL 体系见表 1。

表 1 RT 反应体系

| 成分 | 用量 μL |
|--------------------------------|---------------------|
| 10 mmol/L dNTPs | 2.0 |
| 5 \times RT 缓冲液 | 4.0 |
| 25 pmol/ μL 下游引物 | 2.0 |
| (40U/ μL)RNasinRNA | 0.5 |
| 逆转录酶 | 1.0 |
| DHV- I RNA | 10.5 |

反应参数设置:

- 第一阶段,42℃,60 min。
- 第二阶段,95℃ 5 min。
- 第三阶段,4℃ 5 min。

6.6.2 PCR 反应

PCR 反应体系,采用 50 μL 反应体系见表 2。

表 2 PCR 反应体系

| 成分 | 用量 μL |
|---|---------------------|
| 10 \times PCR 缓冲液(Mg^{2+}) | 5.0 |
| 25 pmol/ μL 上游引物 | 1.0 |
| 25 pmol/ μL 下游引物 | 1.0 |
| 10 mmol/L dNTPs | 4.0 |
| 5 U/ μL Taq 酶 | 1.0 |
| RT 产物 | 10.0 |
| ddH ₂ O 水 | 28.0 |

6.6.3 扩增程序及反应条件

将 PCR 反应管置于 PCR 扩增仪,反应参数设置:

- 第一阶段,95 ℃预变性 5 min。
- 第二阶段,94 ℃变性 1 min、50 ℃退火 1 min、72 ℃延伸 1 min,共 30 个循环。
- 第三阶段,72 ℃延伸 10 min,最后 4 ℃保存。

6.7 PCR 产物的电泳检测

用 TAE 电泳缓冲液配制成 1% 琼脂糖平板(溴化乙锭终浓度 0.5 $\mu\text{g/mL}$)。将平板放入水平电泳槽中,加入 1×TAE 电泳缓冲液刚刚高出凝胶表面,将 PCR 扩增产物 6 μL 与 6 μL 上样缓冲液混合,分别加入样品孔中,取 5 μL DNA Marker DL 2 000 加入到标准相对分子质量对照孔内。5 V/cm 恒压电泳 30 min~45 min。

6.8 结果判定

用凝胶成像系统进行分析。阳性样品扩增一条大小为 440 bp 的特异性条带,阴性对照和空白对照应无该特异性条带;在阴性和阳性对照成立情况下,如被检样品无条带,则结果为阴性,如被检样品有条带,大小为 440 bp,即判定为 DHV-1 病毒核酸阳性。取 PCR 扩增产物进行序列测定,进一步确认待测样品的结果。序列参见附录 C。

如果出现与设计长度不同的条带,为非特异性反应;需重复试验,两次试验都为非特异性反应时,可判为阴性。

7 实时荧光 PCR 试验

7.1 仪器、材料与试剂

7.1.1 仪器

荧光 PCR 检测仪、低温高速离心机、组织匀浆器。

7.1.2 材料

可调微量移液器(200 μL ~1 000 μL 、20 μL ~200 μL 、2 μL ~20 μL 、0.5 μL ~10 μL)、离心管和吸头(处理方法同 6.1.2)、光学 PCR 反应管。

7.1.3 试剂

Trizol、三氯甲烷、异丙醇、75%乙醇、DEPC 水、反转录酶、dNTPs(每种浓度均为 10 mmol/L)、5×RT 缓冲液、RNA 抑制剂 RNasin(40 U/ μL)、Taq DNA 聚合酶(5 U/ μL)、TE(pH 8.0)、Ex Taq DNA 聚合酶(5 U/ μL)、10×Ex Taq buffer、dNTPs 2.5 mmol/L、上、下游引物均为 20 pmol/ μL 、探针 10 pmol/ μL 。商品化的荧光 PCR 试剂盒可以用来进行荧光 PCR 反应体系的配制。

7.2 阳性对照

同 6.2。

7.3 阴性对照

同 6.3。

7.4 引物与探针

根据 GenBank 中 DHV I 的非结构蛋白基因序列,设计合成一对特异性引物:上游引物 5'-ATG-TAACTGATGAGATATGGCAGGT-3',下游引物 5'-TTGATGTCATATCCCAAGACAGC-3',均配制成 20 pmol/ μ L, -20 ℃ 保存;TaqMan 探针(FAM)5'-FAM-ATGTGTTTCAGGATCCCCATGTAC-TACCGT-TAMRA-3'(TAMRA)均配制成 10 pmol/ μ L, -20 ℃ 保存。

7.5 RNA 抽提

按照 6.5 或按照 RNA 抽提试剂盒操作说明提取病毒 RNA。同时设阳性对照和阴性对照。

7.6 荧光 PCR 检测

7.6.1 荧光 PCR 反应体系

见表 3。

表 3 荧光 PCR 反应体系

| 成分 | 用量 μ L |
|--------------------|---------------|
| 5 U/ μ L 逆转录酶 | 0.5 |
| 5 U/ μ L Taq 酶 | 0.5 |
| 10×Ex Taq 缓冲液 | 2.5 |
| dNTPs | 2.5 |
| 上游引物 | 0.5 |
| 下游引物 | 0.5 |
| 探针 | 1.0 |
| DHV RNA | 5.0 |
| 灭菌三蒸水 | 12.0 |

总体积为 25 μ L 体系,用漩涡混匀器进行混匀,瞬间离心,备用。

7.6.2 荧光 PCR 反应参数

在检测区进行。将 7.6.1 中加样后的 PCR 管放入荧光 PCR 检测仪内,记录样本摆放顺序。反应参数设置:

- 第一阶段,40 ℃ 25 min。
- 第二阶段,94 ℃ 3 min。
- 第三阶段,93 ℃ 15 s、55 ℃ 45 s(在此收集荧光)、40 个循环。

7.7 结果判定

7.7.1 结果分析条件设定

读取检测结果。阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品扩增曲线的最高点,不同仪器可根据仪器噪音情况进行调整。

7.7.2 质控标准

阴性对照无 Ct 值并且无扩增曲线。

阳性对照的 Ct 值应 ≤ 32.0 ,并出现特定的扩增曲线。

如阴性对照和阳性对照条件不满足以上条件,此实验视为无效,需重做。

7.7.3 结果描述及判定

阴性:无 Ct 值并且无扩增曲线,表明样品中无鸭病毒性肝炎 I 型病毒核酸。

阳性:Ct ≤ 32.0 ,且出现特定的扩增曲线,表示样品中存在鸭病毒性肝炎 I 型病毒核酸。

8 病毒中和试验

8.1 仪器、材料与试剂

8.1.1 仪器

生物安全柜、高速冷冻离心机、孵化箱。

8.1.2 材料

一次性注射器(1 mL,5 mL)、吸管(5 mL,10 mL)、0.22 μm 滤器。

8.1.3 试剂

生理盐水、青霉素、链霉素、DHV I 阳性血清(在国内诊断检疫仅用 DHV I,对进境鸭的检疫还应加上 DHV II、DHV III 抗血清)。

8.2 实验动物

12~14 日龄的易感健康鸭胚、也可选用 9~10 日龄的 SPF 鸡胚。

8.3 操作方法

8.3.1 病料处理

无菌采取数例病鸭的肝脏组织 10 g,于研钵中剪碎匀浆,按 1:10(质量:体积)加入生理盐水。将匀浆液转至 5 mL 灭菌离心管中,4 $^{\circ}\text{C}$,3 000 r/min 离心 10 min。弃去上层脂肪,抽取中间清亮的液体,再经无菌的 0.22 μm 滤器过滤,收集滤过的液体,加入抗菌素至终浓度为青霉素 2 000 IU/mL,链霉素 2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$,作为病料样品直接接种;或分装灭菌容器中,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存待检,保存期不超过 1 年。取 0.5 mL 病料样品,加入 4.5 mL 的生理盐水,制备成 100 倍稀释的待检病毒液。

8.3.2 试验

选取 75 只鸭胚或鸡胚,分为 A、B 和 C 共三组,每组各 25 只胚,处理如下:

- A 组(中和试验组):取 2 mL 阳性血清和 2 mL 的待检病毒液,混合均匀。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中作用 30 min 后,每胚经尿囊腔接种 0.2 mL。
- B 组(接种试验组):取 2 mL 的生理盐水,加入 2 mL 待检病毒液,混匀,每只胚经尿囊腔接种 0.2 mL。
- C 组(对照组):每只胚经尿囊腔接种 0.2 mL 的生理盐水。

将上述三组接种的鸭(鸡)胚用石蜡封口后,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵化箱内继续孵化,每天照蛋 2 次,剔除接种

后 24 h 内死亡的胚,分组记录其死亡情况及胚胎剖检病变。观察至第 7 d(如用鸡胚,则为 10 d)。

8.4 结果判定

当 C 组中没有任何胚胎死亡,才可进行如下判定,否则应重检。

- a) 阳性结果:B 组特征性死亡的鸭(鸡)胚总数达 20%以上(含 20%),而 A 组的胚不死亡。
- b) 可疑结果:B 组特征性死亡的鸭(鸡)胚总数低于 20%,而 A 组的胚不死亡。此可疑结果应重检,仍为可疑时则判为阳性。
- c) 阴性结果:A 组和 B 组的胚均不死亡。

9 微量血清中和试验

9.1 仪器、材料与试剂

9.1.1 仪器

生物安全柜、高速冷冻离心机、CO₂ 培养箱、倒置显微镜、水浴锅。

9.1.2 试剂

生理盐水、维持液、培养液、胎牛血清、鸡血清、胰蛋白酶、谷氨酰胺、Hank's 无钙镁平衡盐溶液、抗菌素溶液、琼脂糖维持液、10%福尔马林、1%的结晶紫。

9.1.3 材料

DHV I 型毒株、1 mL 离心管、DHV I 型阳性血清、DHV I 型阴性血清、DEL 细胞单层的准备、DEK 细胞悬液的准备(见 B.2)、移液器(200 μL~1 000 μL,20 μL~200 μL)及吸头、0.22 μm 滤器、96 孔细胞培养板和 6 孔细胞培养板。

9.2 病毒毒价(TCID₅₀)测定

取 DHV-I 细胞适应毒用稀释液将进行 10 倍系列稀释,加入 96 孔培养板内,每孔 50 μL,每个稀释度接种 8 个培养孔,然后每孔加入 100 μL 的 DEK 细胞悬液,然后每孔补加稀释液 50 μL。加盖后,置 37 °C 5% 二氧化碳培养箱培养 96 h,取出观察并记录 CPE,按 Reed-Muench 方法计算出病毒的 TCID₅₀,使用前配制成含 200 TCID₅₀/50 μL 的病毒悬液备用。

9.3 操作步骤

9.3.1 血清灭活

DHV 阳性血清、阴性血清、被检血清样品经 56 °C,30 min 灭活。

9.3.2 血清稀释及中和感作

分别取阳性血清、阴性血清、被检血清样品,用稀释液作两倍系列稀释,从稀释度 1:4 开始每个稀释度加入等量病毒悬液,稀释度 1:2 的加入等量的稀释液用作血清对照,然后置 37 °C 中和感作 60 min。

9.3.3 病毒对照设立

将病毒稀释为 1 000 TCID₅₀/50 μL,100 TCID₅₀/50 μL,10 TCID₅₀/50 μL,1 TCID₅₀/50 μL,每个

稀释度做4孔,每孔加入50 μL ,再加入100 μL 的DEK细胞悬液,每孔补加稀释液50 μL 。

9.3.4 中和试验

将感作好的血清混合液加入96孔板内(第1~11孔),每孔100 μL ,每个稀释度需做4个孔,第12孔加入100 μL 的稀释液用作正常细胞对照,然后原代DEK细胞用含10%胰酶消化大豆蛋白磷酸盐肉汤、2 mmol/L谷氨酰胺、0.17%碳酸氢钠和2%鸡血清的BME细胞生长液调整为 3×10^5 个/mL,取100 μL DEK细胞悬液加到上述病毒血清混合物。置37 $^{\circ}\text{C}$ 3%~5%二氧化碳培养箱培养96 h,取出后在低倍倒置显微镜观察并记录CPE,或用10%福尔马林固定和1%的结晶紫染色后观察。

9.4 结果判定

当细胞对照和血清对照正常,阴性血清各孔出现CPE,阳性血清效价与原滴定的效价相差1个滴度以内,病毒对照的回归滴度与原测定滴度相差不超过 10 ± 0.5 时,整个试验有效。能够完全抑制病毒产生CPE的血清最高稀释倍数为该血清的抗体中和效价。血清抗体效价在1:16以上(含1:16)判为阳性。

附 录 A
(规范性附录)
溶液配制

A.1 青霉素、链霉素

取青霉素 100 万单位,链霉素 1 g,溶于 100 mL 灭菌 Hank's 平衡盐溶液,浓度为青霉素 10 000 U/mL 和链霉素 10 000 $\mu\text{g/mL}$ 。青霉素的工作浓度为 2 000 U/mL,链霉素的工作浓度为 2 000 $\mu\text{g/mL}$ 。

A.2 Hank's 平衡盐溶液

氯化钠 8.0 g,葡萄糖 1.0 g,氯化钾 0.4 g,磷酸氢二钠 0.12 g,磷酸二氢钾 0.06 g,酚红 0.02 g,氯化钙(含 2 个水)0.18 g,硫酸镁(含 7 个水)0.2 g,加水至 1 000 mL,115 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min,冷却后放 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用,使用前用 3.5% 的碳酸氢钠调整 pH 值至 7.2。

A.3 Hank's 无钙镁平衡盐溶液

氯化钠 8.0 g,葡萄糖 1.0 g,氯化钾 0.4 g,磷酸氢二钠 0.12 g,磷酸二氢钾 0.06 g,酚红 0.02 g,加水至 1 000 mL,115 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min,冷却后放 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用,使用前用 3.5% 的碳酸氢钠调整 pH 值至 7.2。

A.4 抗菌素溶液

选用庆大霉素,按每毫升含 1 万单位用水配制,放 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

A.5 胰酶消化液

用 Hank's 无钙、镁平衡盐溶液配成 0.125% 溶液,经过滤除菌后分装, -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

A.6 细胞培养液

MEM 培养基 500 mL(或按说明配制)4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用,使用时按 10% 的 FCS、2 mmol/L 谷氨酰胺、0.17% 的碳酸氢钠和 1% 的抗菌素溶液加入配成细胞培养液。

A.7 维持液

MEM 培养基 500 mL(或按说明配制)4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用,使用时加入 1% 的抗菌素溶液。

A.8 琼脂维持液

MEM 培养基 500 mL(或按说明配制)4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用,使用时按 4% 加入鸡血清和按 0.2% 加入

FCS,然后再与等量的2%琼脂溶液混合,并使混合液温度保持在45℃左右备用。

A.9 稀释液

BME培养基500 mL(或按说明配制)4℃保存备用,使用时加入1%的抗菌素溶液。

A.10 细胞生长液

BME培养基500 mL(或按说明配制)4℃保存备用,使用时按10%的胰酶消化大豆蛋白磷酸盐肉汤(Tryptose phosphate broth),2 mmol/L 谷氨酰胺,0.17%的碳酸氢钠,1%的抗菌素溶液和2%的鸡血清加入配成细胞生长液。

A.11 离心管、吸头处理方法

离心管、吸头应放在0.1%DEPC水中浸泡24 h以上,取出烘干DEPC水后再121℃高压灭菌30 min,晾干后使用。

A.12 DEPC 双蒸水

1 mL的DEPC加到1 000 mL双蒸馏水中,室温放置24 h以上,121℃高压灭菌30 min。4℃或室温保存。

A.13 50×Tris-冰乙酸(TAE)电泳缓冲液

Tris 242.0 g,冰乙酸 57.10 g,0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)100 mL,用三蒸水定容至1 000 mL,121℃高压灭菌30 min,备用。

A.14 10 mg/mL 溴化乙锭溶液

溴化乙锭1 g,三蒸水100 mL,置棕色瓶中,磁力搅拌数小时以确保其完全溶解,然后室温避光保存。

A.15 1%琼脂糖凝胶的配制

琼脂糖1 g,TAE电泳缓冲液(50倍)2 mL,灭菌三蒸水98 mL,微波炉中完全融化,加入溴化乙锭(EB)溶液5 μL。

附 录 B
(规范性附录)
原代细胞制备

B.1 DEL 细胞单层准备

选用来自健康种鸭群的 14 d~17 d 的鸭胚,用碘酒和酒精消毒蛋壳表面,打开气室,以灭菌镊子取出鸭胚,放在灭菌平皿内,剖腹取出肝脏(去除胆囊)。放于烧杯内用 Hank's 平衡盐溶液冲洗三次,用灭菌剪刀剪碎,再用 Hank's 平衡盐溶液冲洗三次(加入溶液后让组织块自然下沉,再将溶液倒出),尽可能去除血液;然后加入 5~10 倍于组织碎块的量的胰酶消化液,置 37 ℃ 水浴消化 20 min,吸去胰酶消化液,加入细胞培养液洗涤两次,然后加入细胞培养液,轻轻吹打,使其完全分散(使肉眼不能看到组织碎块为止)。移入刻度离心管,以 500 r/min 离心 1 min,取细胞泥,按每毫升含 1.5×10^5 个细胞的比例用细胞培养液稀释,然后加入培养瓶(板),加盖后置 37 ℃,含 5%CO₂ 的培养箱培养。48 h~72 h 长成细胞单层备用。

B.2 DEK 细胞悬液的配备

选用来自健康种鸭群的 22 d~25 d 的鸭胚,用碘酒和酒精消毒蛋壳表面,打开气室,以灭菌镊子取出鸭胚,放在灭菌平皿内,剖腹取出肾脏,放于烧杯内用 Hank's 平衡盐溶液冲洗三次,用灭菌剪刀剪碎,再用 Hank's 平衡盐溶液冲洗三次(加入溶液后让组织块自然下沉,再将溶液倒出),尽可能去除血液;然后加入 5~10 倍于组织碎块的量的胰酶消化液,置 37 ℃ 水浴消化 20 min,吸去胰酶消化液,加入细胞生长液洗涤两次,然后加入细胞生长液,轻轻吹打,使其完全分散(使肉眼不能看到组织碎块为止)。移入刻度离心管,以 500 r/min 离心 10 min,取细胞泥,按每毫升含 3×10^5 个细胞的比例用细胞生长液稀释,配成细胞悬液备用。

附 录 C
(资料性附录)
DHV I 基因扩增片段

1 acaatgacce agccttagtg aaaagaattc atgcaccaac tatctattca actcattatg
61 taactgatga gatatggcag gtagaaggag ggatgtgttc aggatcccca tgtactaccg
121 tggtaaatc tattgtgaat cagcttgcgt gctacacat tttagctgta ttgggtatg
181 acatcaacca atgttatgtc gttagttagt gggatgactg tttctgtca gtgccagagg
241 tgcgcgatat ctcaaaacta tgcactatt tcaagctttt ctitggtagt acagcaacag
301 ctagtgacaa agaaagtgac ataacttggc tagccctat ggagatagaa tttctgaaga
361 gaactcctgc ctctctccca gggactcgea aaatcattgg tgteettgat aaggaagttt
421 tggaagggaa gatacagtgg

