



中华人民共和国国家标准

GB/T 18089—2008
代替 GB/T 18089—2000

蓝舌病病毒分离、鉴定及血清中和 抗体检测技术

Isolation, identification and serum neutralization antibody
test in Bluetongue virus

2008-12-31 发布

2009-05-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布

前 言

本标准代替 GB/T 18089—2000《蓝舌病微量血清中和试验及病毒分离和鉴定方法》。

本标准与 GB/T 18089—2000 相比主要变化如下：

- 对标准名称进行了修改；
- 删除了蓝舌病病毒鉴定中的病毒中和试验部分；
- 增加了病毒鉴定中 RT-PCR 方法的鉴定。

本标准的附录 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。

本标准起草单位：中华人民共和国云南出入境检验检疫局、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：周晓黎、杨建明、艾军、花群义、杨晓花、张其艳、严树发、董俊、叶玲玲、徐维加。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

- GB/T 18089—2000。

蓝舌病病毒分离、鉴定及血清中和 抗体检测技术

1 范围

本标准规定了蓝舌病病毒分离、鉴定及血清中和抗体检测的技术。

本标准适用于蓝舌病病毒的分离、鉴定及动物感染蓝舌病病毒后血清中和抗体的检测。

2 符号和缩略语

下列符号和缩略语适用于本标准。

BHK₂₁——幼仓鼠肾细胞株；

BLP——乳糖蛋白胨缓冲肉汤；

BT——蓝舌病；

bp——碱基对；

CPE——致细胞病变作用；

C6/36——蚊子细胞株；

DEPC——焦碳酸二乙酯；

SPF——无特定病原体；

TCID₅₀——半数组织培养感染量；

Vero——非洲绿猴肾细胞株。

3 蓝舌病病毒分离

3.1 材料

10日龄~11日龄 SPF 鸡胚。

3.2 设备与器材

鸡胚开孔器、照蛋灯或照蛋箱、乳钵或组织捣碎器、倒置显微镜。

3.3 试验程序

3.3.1 样品

肝素抗凝血(每 5 mL 血液用 10IU 肝素)、脏器(脾、肝、肾、淋巴结)、精液、库蚊。用于病毒分离的样品应置冷藏容器中保存,在 24 h 内送到实验室,并立即进行处理。

3.3.2 血液样品制备

取肝素抗凝血 5 mL,用磷酸盐缓冲液(PBS,配方见附录 A)洗涤血样 3 次~4 次,每次 2 000 r/min 离心 10 min,弃上清液后加入倍量 BLP(配方见附录 A),置冰浴中用超声波处理(40 μ A, 1 min)。经处理的样品当天使用,使用前置 4 $^{\circ}$ C 保存,剩余样品置 -70 $^{\circ}$ C 保存备用。

3.3.3 组织样品制备

无菌采集动物脾、淋巴结、肝、肾各 5 g,剪碎后加入 BLP 10 mL(含青霉素 2 000 IU/mL、链霉素 2 000 μ g/mL),置乳钵中研磨,4 $^{\circ}$ C 冰箱中浸提 4 h,取上清液 5 mL 用超声波裂解处理(100 μ A, 1 min~2 min)或冻融三次,3 000 r/min 离心 20 min,取上清液使用,使用前置 4 $^{\circ}$ C 保存,剩余样品置 -70 $^{\circ}$ C 保存备用。

3.3.4 精液样品制备

取精液样品 0.5 mL,用 BLP 作 1:5 稀释后,3 000 r/min 离心 20 min,弃上清液,再用 BLP 作

1:5 稀释,充分混匀,置冰浴中用超声波处理(100 μ A, 1 min~2 min)或冻融三次,3 000 r/min 离心 20 min,取上清液使用,使用前置 4 $^{\circ}$ C 保存,剩余样品置 -70 $^{\circ}$ C 保存备用。

3.3.5 库蠨样品制备

取 200 个~300 个库蠨盛于小试管中,加入含青霉素 2 000 IU/mL、链霉素 2 000 μ g/mL 的 BLP 3 mL~5 mL,置冰浴中研磨虫体,3 000 r/min 离心 20 min,取上清液使用,使用前置 4 $^{\circ}$ C 保存,剩余样品置 -70 $^{\circ}$ C 保存备用。

3.3.6 鸡胚静脉接种

3.3.6.1 选择 10 日龄~11 日龄发育良好的 SPF 鸡胚,在照蛋灯上标记静脉位置和开孔区,用开孔器开窗备用。

3.3.6.2 在无菌条件下,每份样品接种 5 个鸡胚,每个鸡胚静脉接种 0.1 mL,接种后用擦镜纸封口,置 33.5 $^{\circ}$ C 培养。

3.3.6.3 逐日观察并记录,24 h 内死亡的鸡胚为非特异性死亡,将 48 h 后死亡的鸡胚收置 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存,于接种后第 6 天同未死亡鸡胚一起收毒。

3.3.7 收毒

在无菌条件下,用碘酒、酒精棉球对鸡胚气室处进行消毒,凿开蛋壳,按常规方法剪破壳膜、尿囊膜、羊膜后,取出胚体,置平皿中,在每个胚体上取若干组织块(有病变时,取病变组织),置组织捣碎器或乳钵中研磨后,按 1:5 加 BLP(含青霉素 2 000 IU/mL、链霉素 2 000 μ g/mL),置 4 $^{\circ}$ C 冰箱浸提 4 h,当日使用,剩余样品置 -70 $^{\circ}$ C 保存备用。

3.3.8 接种敏感细胞

3.3.8.1 按常规方法在 12 孔细胞培养板上制备 C6/36 细胞单层。

3.3.8.2 将收获的鸡胚上清液,接种细胞单层,每份病料接种两孔,每孔接种 0.1 mL,置 25 $^{\circ}$ C 培养,第 2 天换液后,培养。

3.3.8.3 按常规方法在 12 孔细胞培养板上制备 BHK₂₁ 或 Vero 细胞单层。

3.3.8.4 第 7 天用吸管吹下被接种的 C6/36 细胞。

3.3.8.5 将吹下的 C6/36 细胞悬液接种于 BHK₂₁ 或 Vero 细胞单层,37 $^{\circ}$ C 吸附 1 h 后,加入维持液置 37 $^{\circ}$ C 培养。24 h 后开始观察细胞病变,连续观察 7 d。如首传两代出现细胞病变,则应进行荧光抗体、PCR 试验进行鉴定;如无细胞病变,则判定为病毒分离阴性。

4 蓝舌病病毒鉴定

4.1 荧光抗体试验(直接法)

4.1.1 材料

荧光标记的蓝舌病病毒单克隆抗体。

4.1.2 设备与器材

倒置荧光显微镜、96 孔细胞培养板。

4.1.3 试验程序

4.1.3.1 将接种的 BHK₂₁ 或 Vero 细胞培养物冻融一次,1 000 r/min 离心 10 min,取上清液接种于带有玻片的 24 孔组织培养板的 BHK₂₁ 或 Vero 细胞单层。每份样品接种两孔,同时设阳性、阴性对照,37 $^{\circ}$ C 吸附 1 h 后加入维持液,置 37 $^{\circ}$ C 培养 72 h。

4.1.3.2 取出培养板中的玻片,用 0.01 mol/L PBS 漂洗一次,预冷丙酮固定 15 min。

4.1.3.3 每片滴加荧光标记的蓝舌病病毒单克隆抗体,使其覆盖于玻片,置暗湿盒中于 37 $^{\circ}$ C 作用 30 min。

4.1.3.4 用 0.01 mol/L PBS 洗片三次,再用蒸馏水洗片一次。

4.1.3.5 风干,用碳酸缓冲甘油(配方见附录 A)封片,荧光显微镜检查。

4.1.3.6 结果判定:阳性对照的细胞浆内呈现颗粒状的黄绿色荧光,阴性对照应无荧光或无特异性荧光时,被检病毒接种细胞的细胞浆内发现颗粒状的黄绿色荧光者即可判为阳性。

4.2 聚合酶链反应(RT-PCR)

4.2.1 试剂和材料

4.2.1.1 引物(25 pmol/ μ L):扩增 NS1 蛋白编码基因 RNA6 保守序列,其引物序列和在 RNA6 基因中的位置如表 1 所示。

表 1

| 编号 | 引物 | 在 RNA6 中的位置 |
|----|-----------------------------|-------------|
| 1 | 5'-GTTCTCTAGTTGGCAACCACC-3' | 10~30 |
| 2 | 5'-AAGCEAGACTGTTTCCCGAT-3' | 283~264 |
| 3 | 5'-GCAGCATTTTGAGAGAGCGA-3' | 170~189 |
| 4 | 5'-CCGATTCATACATTGCTTCCT-3' | 270~250 |

4.2.1.2 Trizol。

4.2.1.3 AMV (15 U/ μ L)或 M-MLV (200 U/ μ L)。

4.2.1.4 dNTPs 每种浓度均为 10 mmol/L。

4.2.1.5 RNA 酶抑制剂(40 U/ μ L)。

4.2.1.6 Taq 酶(5 U/ μ L)。

4.2.1.7 RT-PCR 和 PCR 缓冲液。

4.2.1.8 氯化镁(5 mmol/L)。

4.2.1.9 电泳缓冲液(TBE):配方见附录 A。

4.2.1.10 溴化乙锭溶液(10 mg/mL):配方见附录 A。

4.2.1.11 DEPC 水:配方见附录 A。

4.2.1.12 琼脂糖。

4.2.1.13 DNA 分子量标准。

4.2.1.14 随机引物:25 mmol/L。

4.2.1.15 三氯甲烷、无水乙醇、异丙醇等均分析纯。

4.2.2 主要仪器和设备

高速冷冻离心机、PCR 仪、凝胶电泳仪、水平电泳槽、凝胶管理系统、微量移液器。

4.2.3 试验程序

4.2.3.1 样品的采集与处理

不同样品参照 4.3.2~4.3.5 的处理方法。

4.2.3.2 对照样品制备

4.2.3.2.1 阳性样品:接种病毒的细胞培养物。

4.2.3.2.2 阴性样品:正常细胞培养物。

4.2.3.3 RNA 的提取

除本标准规定的方法外,也可采用其他等效的 RNA 提取方法,具体操作见有关试剂说明书。

4.2.3.3.1 取 250 μ L 处理后的样品置 1.5 mL Eppendorf 管中,作好标记,加入 3 倍体积 Trizol,振荡混合 20 s,静置 5 min。

4.2.3.3.2 加入 200 μ L 三氯甲烷,振荡混合 20 s,静置 5 min。

4.2.3.3.3 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 15 min,取上清置另一个标记好的 1.5 mL Eppendorf 管中,加入等体积异丙醇,-20 $^{\circ}$ C 静置 15 min。

4.2.3.3.4 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 15 min,轻轻弃上清,加 1 mL DEPC 水配制的 75%乙醇;4 $^{\circ}$ C

12 000 r/min 离心 15 min,小心弃去乙醇,倒置滤纸上,烘干,立即进行 cDNA 的合成或-20 ℃保存备用。

4.2.3.4 cDNA 的合成

以下所有操作应在冰盒上进行。

4.2.3.4.1 RNA 的变性

在沉淀核酸的 Eppendorf 管中依次加入:随机引物,2 μL;DEPC 水,12 μL。轻微振荡,瞬时离心;70 ℃作用 10 min,冰浴 2 min;3 000 r/min,离心 1 min。

4.2.3.4.2 反转录

在超净台内于 Eppendorf 管(4.2.3.4.1)中依次加入:5×反转录酶缓冲液,4 μL;dNTPs,1 μL;RNA 酶抑制剂,0.5 μL;AMV 反转录酶,0.5 μL。瞬时离心,42 ℃作用 1 h;70 ℃作用 15 min;冰浴 3 min,立即进行 PCR 扩增或-20 ℃保存备用。

4.2.3.5 PCR 反应

在一 PCR 管中,依次加入以下试剂:10×PCR 缓冲液,5 μL;氯化镁,3 μL;dNTPs,1 μL;Taq DNA 聚合酶,0.5 μL;引物 1,1 μL;引物 2,1 μL;cDNA,4 μL;ddH₂O,34.5 μL。

瞬时离心,置 PCR 仪内运行下列程序:95 ℃预变性 3 min;95 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,运行 35 个循环;72 ℃,10 min;4 ℃,保存。

套式 PCR 扩增(Nested PCR 扩增):

在一 PCR 管中,依次加入以下试剂:10×PCR 缓冲液,5 μL;氯化镁,3 μL;dNTPs,1 μL;Taq DNA 聚合酶,0.5 μL;引物 3,1 μL;引物 4,1 μL;第一次扩增产物,1.5 μL;ddH₂O,37 μL。

瞬时离心,置 PCR 仪内运行下列程序:95 ℃预变性 3 min;95 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,运行 30 个循环;72 ℃,10 min;4 ℃,保存。

4.2.3.6 PCR 产物的检测

4.2.3.6.1 1.5%琼脂糖凝胶的制备见附录 A。

4.2.3.6.2 加载样品:取两次扩增产物各 10 μL 与载样缓冲液混合,分别加入凝胶孔中。恒压 5 V/cm~8 V/cm,电泳 30 min~60 min;紫外检测仪下观察结果、照像。

4.2.3.7 结果判定

4.2.3.7.1 第一次 PCR 扩增后,阳性对照应出现一条 274 bp 的 DNA 条带。阴性对照和空白对照没有核酸条带。

4.2.3.7.2 第二次 PCR 扩增后,阳性对照应出现一条 101 bp 的 DNA 条带。阴性对照和空白对照没有核酸条带。

4.2.3.7.3 在阳性样品第一次 PCR 扩增或第二次 PCR 扩增出现目的核酸条带,而阴性对照和空白对照均成立的情况下,进行检测样品的判定。

4.2.3.7.4 待检样品第一次扩增经电泳出现 274 bp 的 DNA 条带,或第二次扩增经电泳能出现 101 bp 的 DNA 条带,均可判为阳性。

4.2.3.7.5 待检样品两次扩增经电泳均未出现 DNA 条带,判为阴性。或者出现的条带不是 274 bp 和 101 bp,为非特异性反应,需重复试验,两次试验均为非特异性反应时,判为阴性。

5 蓝舌病病毒血清中和抗体检测

5.1 试剂和材料

5.1.1 病毒:蓝舌病病毒 1~24 血清型国际标准毒株。

5.1.2 对照血清:蓝舌病标准阳性血清、阴性血清。

5.1.3 被检血清:采集绵羊等反刍动物血液所分离的血清,-20 ℃保存。

5.1.4 细胞:C6/36、BHK₂₁或 Vero。

5.1.5 培养液:配方见附录 A。

5.1.6 维持液/稀释液:配方见附录 A。

5.2 设备与器材

二氧化碳培养箱、冰箱($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存血清, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存种毒)、倒置显微镜、96孔细胞培养板、单头和多头微量移液器($20\text{ }\mu\text{L}\sim 200\text{ }\mu\text{L}$)。

5.3 试验程序

5.3.1 病毒繁殖

将蓝舌病病毒 1-24(BTV₁₋₂₄)型分别接种于 BHK₂₁或 Vero 细胞单层, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 吸附 1 h 后加入维持液,置 5%二氧化碳(CO₂)培养箱培养,逐日观察。待 CPE 达 75%以上,收获病毒悬液冻融或超声波处理,以 2 000 r/min 离心 20 min,分装成 1 mL/瓶,置 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

5.3.2 毒价测定

将各型病毒在 96 孔板上作 $10^0\sim 10^{-10}$ 稀释,每个稀释度作 8 孔,每孔病毒悬液为 $50\text{ }\mu\text{L}$,加入细胞悬液 $150\text{ }\mu\text{L}$ (每毫升 3×10^5 个细胞),每块板设 8 孔细胞对照。置 5% CO₂ 培养箱 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养,逐日观察并记录 CPE。按 Karber 方法计算出各血清型病毒的 TCID₅₀/50 μL 。

5.3.3 灭能

蓝舌病标准阳性血清、阴性血清、被检血清经 $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 min 灭能。

5.3.4 对照

——细胞对照:设 4 孔正常细胞对照,即每孔加细胞悬液 $100\text{ }\mu\text{L}$ (每毫升 3×10^5 个细胞)、稀释液 $100\text{ }\mu\text{L}$ 。

——阴性血清对照:设 4 孔阴性对照,每孔加阴性血清和 100 TCID₅₀/50 μL 病毒悬液各 $50\text{ }\mu\text{L}$,再加入细胞悬液 $100\text{ }\mu\text{L}$ (每毫升 3×10^5 个细胞)。

——病毒回归对照:将各型病毒稀释成 1 000、100、10、1 TCID₅₀/50 μL ,每个稀释度作 4 孔,每孔加入 $50\text{ }\mu\text{L}$ 病毒悬液,再加入细胞悬液 $100\text{ }\mu\text{L}$ (每毫升 3×10^5 个细胞),每孔补充稀释液 $50\text{ }\mu\text{L}$ 。

——阳性血清对照:将阳性血清分别作 1:4、1:8、1:16 稀释,每个稀释度作 4 孔,每孔加各稀释度阳性血清和 100 TCID₅₀/50 μL 病毒悬液各 $50\text{ }\mu\text{L}$,再加入细胞悬液 $100\text{ }\mu\text{L}$ (每毫升 3×10^5 个细胞)。

——血清毒性对照:每份被检血清应按稀释度各设一孔毒性对照,每孔各加各稀释度血清 $50\text{ }\mu\text{L}$ 、稀释液 $50\text{ }\mu\text{L}$ 和 $100\text{ }\mu\text{L}$ 细胞悬液。

5.3.5 中和试验

5.3.5.1 将每份被检血清作 1:4、1:8、1:16 稀释,每个稀释度作 5 个孔,每孔加各稀释度血清 $50\text{ }\mu\text{L}$ 。

5.3.5.2 第 1 孔作为血清毒性对照,加入稀释液 $50\text{ }\mu\text{L}$ 和细胞悬液 $100\text{ }\mu\text{L}$ (每毫升 3×10^5 个细胞)。

5.3.5.3 第 2 孔~第 5 孔为正式试验孔,每孔加入病毒悬液 $50\text{ }\mu\text{L}$ (100 TCID₅₀/50 μL),振荡 3 min~5 min,置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中和 1 h;加细胞悬液 $100\text{ }\mu\text{L}$ (每毫升 3×10^5 个细胞)。

5.3.5.4 置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂ 培养箱培养,24 h 后逐日观察 CPE 并进行记录,培养 7 d。

5.3.5.5 结果判定:当病毒回归 1 000、100、10 TCID₅₀/50 μL 全部出现 CPE,1 TCID₅₀/50 μL 出现 50% CPE,阳性、阴性、正常细胞、血清毒性对照全部成立时,才能进行判定,判定时间为 72 h~168 h。被检血清孔 50% 出现保护,判为阳性,如低于 50% 判为阴性。当某份血清的某一稀释度出现 50% 保护时,该血清稀释度即为该份血清的中和抗体滴度。当中和抗体滴度 $\geq 1:8$ 时判为阳性。

6 蓝舌病病毒感染检测综合判定标准

在检测中,蓝舌病病毒分离、鉴定与血清中和抗体试验应同时进行,任何一种方法为阳性,均可判定为蓝舌病阳性。

附 录 A
(规范性附录)
溶 液 配 制

A.1 0.01 mol/L PBS, pH7.2~pH7.4

| | |
|-------|----------|
| 磷酸氢二钠 | 1.19 g |
| 磷酸二氢钠 | 0.22 g |
| 氯化钠 | 8.50 g |
| 蒸馏水 | 1 000 mL |

A.2 乳糖蛋白胨缓冲液肉汤(BLP)

A.2.1 A液的配制

| | |
|-----------|--------|
| 磷酸二氢钠(无水) | 4.60 g |
| 三蒸水 | 500 mL |

A.2.2 B液的配制

| | |
|-----------|----------|
| 磷酸氢二钠(无水) | 9.40 g |
| 三蒸水 | 1 000 mL |

A.2.3 工作液的配制

| | |
|-----|--------|
| A液 | 220 mL |
| B液 | 780 mL |
| 蛋白胨 | 2.00 g |
| 乳糖 | 100 g |

1.034×10⁵ Pa 15 min 高压灭菌或抽滤除菌。

A.3 碳酸缓冲甘油

A.3.1 0.5 mol/L pH9.5 碳酸缓冲液的配制

| | |
|---------|--------|
| 碳酸氢钠 | 3.70 g |
| 碳酸钠(无水) | 0.60 g |
| 蒸馏水 | 100 mL |

A.3.2 甘油。

A.3.3 碳酸缓冲甘油的配制

1份碳酸缓冲液加9份甘油混合即成。

A.4 5×Tris-硼酸(TBE)电泳缓冲液

| | |
|-----------------------|----------|
| Tris | 54.0 g |
| 硼酸 | 27.5 g |
| 0.5 mol/L EDTA(pH8.0) | 20 mL |
| 三蒸水定容至 | 1 000 mL |
| 充分溶解,4℃保存。 | |

A.5 10 mg/mL 溴化乙锭溶液

警告——本品为强致癌物,使用时需小心!

| | |
|------|--------|
| 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,然后用铝箔包裹容器,保存于室温。

A.6 DEPC 水

于三蒸水中按 0.1% 加入 DEPC,室温静置过夜, 1.034×10^5 Pa 高压 20 min,冷却备用。

A.7 1.5% 琼脂糖凝胶的制备

在 200 mL 三角烧瓶中加入:电泳级琼脂糖, 1.5 g; $0.5 \times$ TBE 缓冲液, 100 mL。置微波炉中使之完全溶解后,加入 10 mg/mL 溴化乙锭溶液 5 μ L 充分摇匀,备用;待琼脂糖冷却到 60 $^{\circ}$ C 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和两端封口物,将凝胶托盘放入电泳槽,加入 $0.5 \times$ TBE 电泳缓冲液使之高出凝胶 2 mm~3 mm。

A.8 营养液

199 培养基,加入含 10% 无蓝舌病病毒抗体胎牛血清;抽滤除菌。

A.9 维持液

199 培养基,加入含 2% 无蓝舌病病毒抗体胎牛血清;抽滤除菌。

A.10 细胞分散液

| | |
|----------------|----------|
| 胰酶 | 2.5 g |
| 乙二胺四乙酸二钠(EDTA) | 0.2 g |
| 无钙镁 PBS | 1 000 mL |

抽滤除菌。
