

附录 A
(规范性附录)
细胞培养液的制备

A.1 细胞生长液

DMEM 营养液 900 mL
胎牛血清 100 mL
加入青霉素至终浓度 100 IU/mL,链霉素至终浓度 100 μg/mL,充分混匀,过滤除菌后 4℃ 储存备用。

A.2 细胞维持液

DMEM 营养液 980 mL
胎牛血清 20 mL
加入青霉素至终浓度 100 IU/mL,链霉素至终浓度 100 μg/mL,充分混匀,过滤除菌后 4℃ 储存备用。

A.3 细胞消化液

A.3.1 0.25%胰蛋白酶溶液的配制

称取 250 mg 胰蛋白酶粉末,加入少许 D-Hank's,将胰蛋白酶粉末调成糊状,再补足 D-Hank's 至 100 mL,磁力搅拌混匀,使其完全溶解,放置于室温 4 h 或 4℃ 冰箱保存过夜。

A.3.2 0.02%EDTA 的配制

称取 200 mg 的 EDTA·2Na,加 D-Hank's 至 1 L,加入酚红 15 mg,用 NaHCO₃ 或 HCl 调 pH 至 7.2。高压消毒灭菌(6.9×10⁵ Pa,121℃,15 min),分装小瓶,于 4℃ 保存备用。

A.3.3 将 0.02%EDTA 和 0.25%胰蛋白酶 1:1 等量混合。

A.4 青霉素、链霉素(双抗)液

1 g 链霉素(硫酸盐)溶解于 10 mL Hank's 液,再用 8 mL 链霉素(硫酸盐)溶液溶解 800 kIU 的青霉素粉,即配成含为 100 mg/mL 链霉素和 100 kIU/mL 青霉素的双抗母液。使用时,在 100 mL 培养基内加 0.1 mL 母液,则培养基内链霉素浓度为 0.1 mg/mL,青霉素浓度为 100 IU/mL。

附录 B
(规范性附录)
山羊滑膜细胞制备及传代

B.1 GSM 原代细胞的制备

B.1.1 样品处理

无菌采取胎山羊关节滑膜,用 D-Hank's 洗 3 次,剪成 $1\text{ mm}^3 \sim 2\text{ mm}^3$ 的小块,加入少量的细胞生长液,混匀后加入到细胞瓶中,弃去多余液体。

B.1.2 消化

用 3 倍~5 倍体积含 $0.1\text{ mg/mL} \sim 0.3\text{ mg/mL}$ 的胶原酶的 DMEM 消化, 37°C 孵育 4 h,期间可振荡数次。

B.1.3 过滤洗涤

消化后的细胞悬液经孔径为 0.15 mm 的不锈钢网过滤后,收集消化液。消化液 $1\,000\text{ r/min}$ 离心 10 min ,弃去上清液,收集细胞,用 D-Hank's 洗涤。

B.1.4 培养

细胞沉淀用细胞生长液悬浮,调整细胞浓度至 0.5×10^7 个细胞/mL, 37°C 、5% CO_2 条件下培养 24 h,弃去未贴壁细胞,换细胞生长液。此时已贴壁细胞为原代 GSM 细胞,继续培养,直至细胞长成连续单层细胞。

B.2 GSM 细胞的传代

将已长成连续单层的原代 GSM 细胞用无血清 DMEM 洗 2 次,用细胞消化液消化后加入细胞生长液重悬细胞。细胞悬液 $1\,000\text{ r/min}$ 离心 10 min ,用细胞生长液重浮细胞,调整细胞浓度至 0.5×10^7 个细胞/mL,分瓶培养。

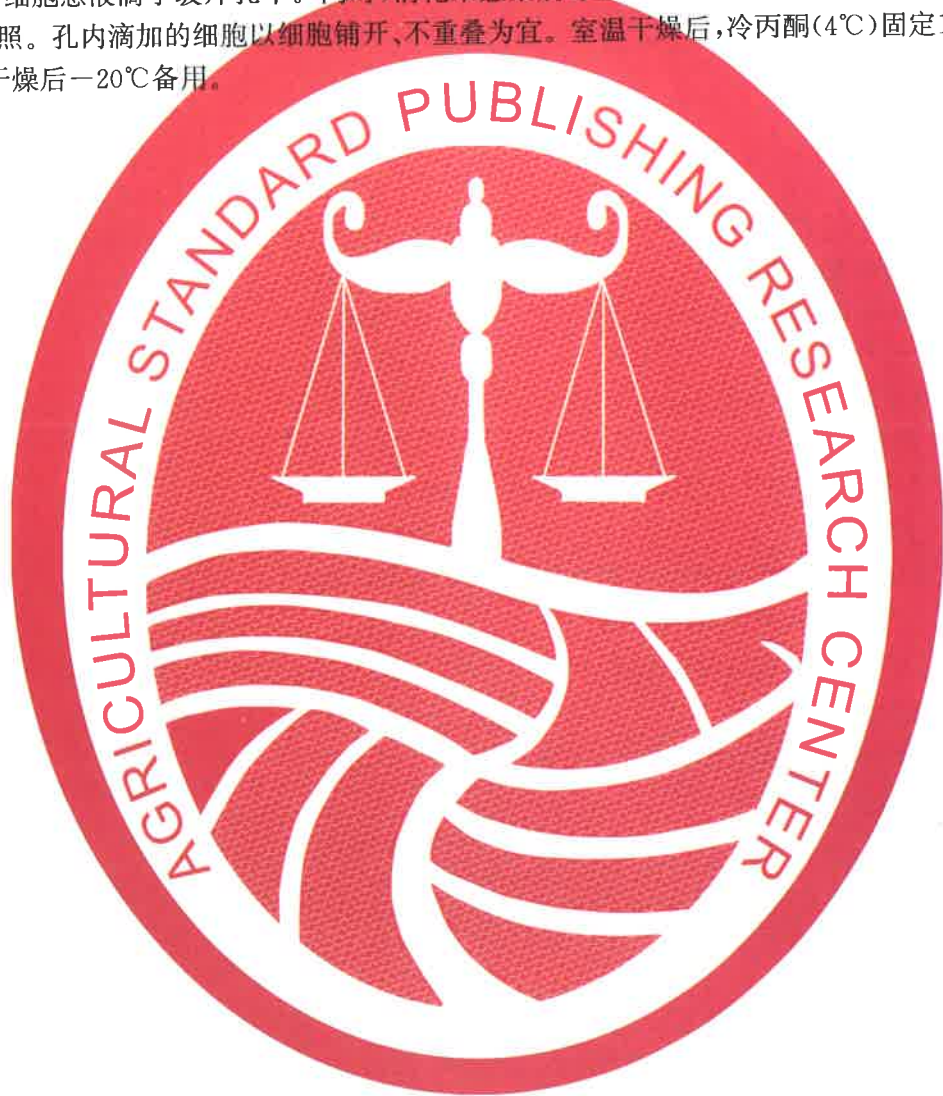


附 录 C
(规范性附录)
肺泡巨噬细胞的制备

山羊动脉放血致死后,从颈部剖开至腹腔,避免伤到气管和肺脏。用棉线结扎气管上部,然后剪断气管,将气管和肺脏完整取出来。用 PBS 冲洗干净肺脏表面。在无菌条件下,用灭菌好的剪刀剪断结扎了的气管,吸取 PBS 灌进肺内。充盈后,用手轻轻捏揉肺叶数次,再把肺内液体倒入蓝盖瓶中。重复灌洗 2 次。收集的液体分装到 50 mL 离心管中,1 000 r/min 离心 10 min。细胞沉淀用 PBS 或细胞维持液清洗离心 1 次后制成细胞悬液。

附录 D
(规范性附录)
细胞培养飞片的制备

病毒接种细胞出现病变或确知细胞内含有丰富的病毒抗原后,用胰酶消化细胞,PBS洗涤3次,用适量PBS悬浮细胞,将细胞悬液滴于玻片孔中。同时,消化未感染病毒的同批细胞,滴加同一玻片另一孔内,作为正常细胞对照。孔内滴加的细胞以细胞铺开、不重叠为宜。室温干燥后,冷丙酮(4℃)固定10 min后,PBS漂洗,充分干燥后-20℃备用。



附录 E
(规范性附录)
间接免疫荧光操作步骤

E.1 试剂耗材

E.1.1 固定液

甲醛(40%)	100 mL
Na ₂ HPO ₄	6.5 g
NaH ₂ PO ₄	4.0 g

加水至 1 L,调整 pH 为 7.4。

E.1.2 PBST 洗涤液

0.1 mol/L PBS	50 mL
吐温-20	0.25 mL

加水定容至 500 mL。

E.1.3 封闭液

BSA 粉末 1 g,加入 PBST 溶液定容至 100 mL。

E.1.4 荧光抗体

商品化的标记有荧光素或者罗丹明的抗山羊免疫球蛋白。

E.1.5 山羊关节炎脑炎阳性血清。

E.1.6 山羊关节炎脑炎阴性血清。

E.1.7 50%甘油

丙三醇 50 mL,加入水定容至 100 mL。

E.1.8 盖玻片。

E.2 仪器设备

荧光显微镜。

E.3 操作步骤

E.3.1 取出细胞培养飞片,室温干燥后,1% BSA 封闭,37℃ 孵育 1 h。

E.3.2 PBST 洗 3 次,每次 5 min,室温干燥。

E.3.3 将适当稀释的山羊关节炎脑炎阳性血清、阴性血清分别滴于细胞培养飞片上,置于湿盒内,37℃ 孵育 30 min~45 min。

E.3.4 PBST 洗 3 次,每次 5 min,室温干燥。

E.3.5 取适当稀释的荧光抗体,滴加于细胞培养飞片上,37℃ 孵育 30 min~45 min。

E.3.6 PBST 洗 3 次,每次 5 min,室温干燥。

E.3.7 50%甘油封片,荧光显微镜下观察。

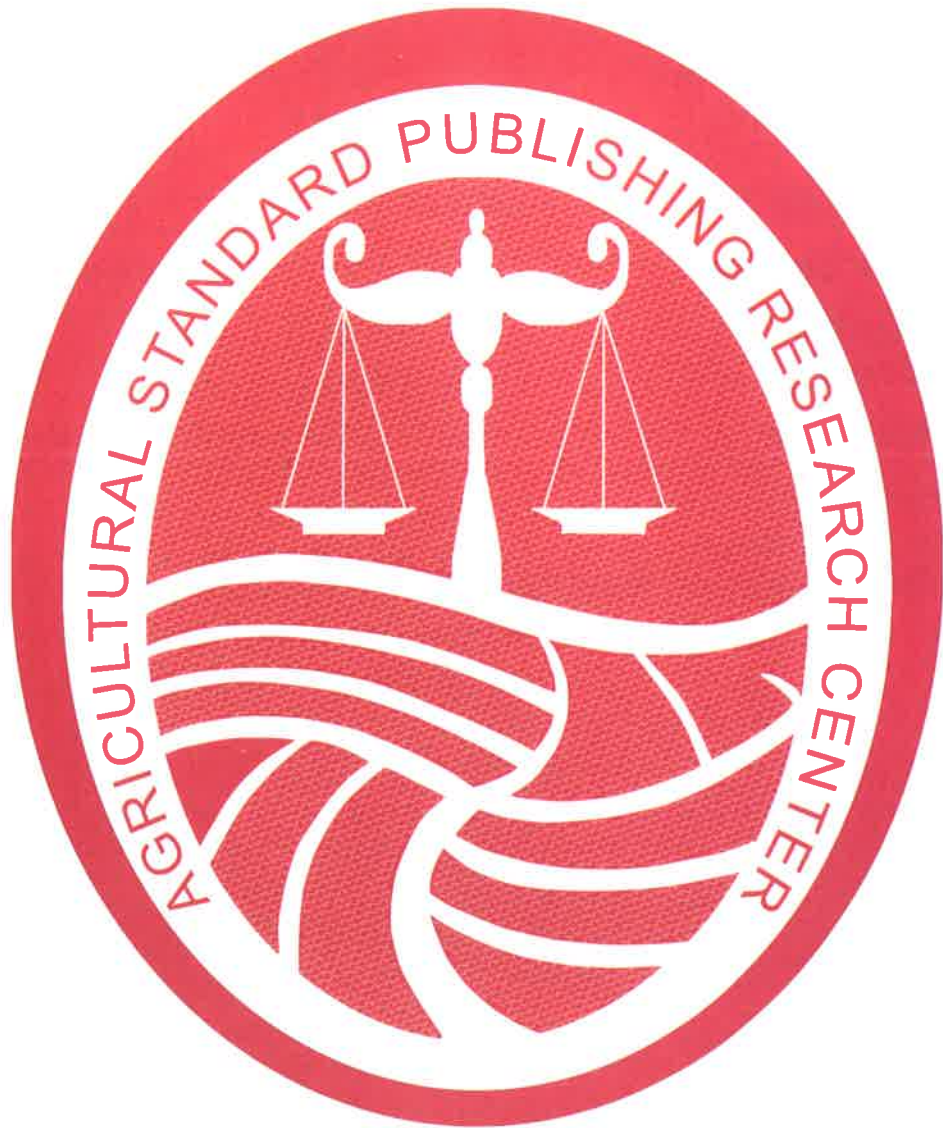
E.4 结果判定

E.4.1 试验成立条件

阴性血清与正常细胞和病毒感染细胞反应均无荧光,阳性血清与正常细胞反应无荧光。

E.4.2 结果判定

细胞培养飞片与阳性血清荧光反应,与阴性血清无荧光反应,则判定细胞培养飞片为阳性。



附录 F
(规范性附录)
PCR 试验用溶液的配制

F.1 5×TBE 电泳缓冲液

三羟甲基氨基甲烷(Tris)	54 g
乙二胺四乙酸(EDTA)	2.9 mg
硼酸	27.5 g

加入灭菌双蒸水 1 L,用 5 mol/L 的盐酸调 pH 至 8.0。

F.2 1×TBE 电泳缓冲液

电泳缓冲液(5×)	100 mL
灭菌双蒸水	400 mL

F.3 1%琼脂糖凝胶

琼脂糖(电泳级)	2 g
TBE 电泳缓冲液(5×)	40 mL

加灭菌双蒸水至 200 mL,微波炉中完全融化。

附 录 G
(规范性附录)
PCR 方法引物序列和特异性片段

G.1 引物序列

见表 G.1。

表 G.1 引物序列

引物	靶基因	序列(5'-3')	大小
正向引物	gag	5'-AACTGGAAAGCAGTAGAC-3'	591 bp
反向引物	gag	5'-TACACTAGCTTGTTCAC-3'	

G.2 扩增的片段序列

AACTGGAAAGCAGTAGACTCAGTAATGTTCCAGCAACTGCAAACAGTAGCAATGCAGCA
TGGCCTCGTGTCTGAGGACTTTGAAAGGCAGTTGGCATATTATGCTACTACGTGGACAAGTA
AAGACATATTAGAAGTATGGCCATGATGCCAGGAAATAGAGCTCAAAGGAGSCTAATTCA
AGGGAAATTAATGAAGAAGCAGAAAGGTGGAGAAGAAATAATCCACCACCTCCAGTAGGA
GGAGGATTAACAGTGGATCAGATTATGGGAGCAGGACAAACAAATCAAGCAGCAGCACAAAG
CTAACATGGATCAGGCAAGACAAATATGCCTGCAATGGGTAATAATAGCCTTAAGAGCAGT
GAGGCATATGGCTCATAGGCCAGGAAATCCCATGTTAGTAAGGCAAAAAGCAAATGAGTCA
TATGAAGAATTTGCAGCAAACTGCTAGAAGCAATAGATGCAGAACCAGTTACACAGCCTA
TAAAAGACTATCTGAAGCTAACATTATCTTATACAAATGCATCATCAGATTGTCAAAAGCA
AATGGATAGAGTACTAGGACAAAGAGTGCAACAAGCTAGTGTA

附 录 H
(规范性附录)

琼脂凝胶免疫扩散试验的溶液配制

0.01 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液(PBS)配制:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.17 g

NaH_2PO_4 0.22 g

NaCl 8.50 g

加双蒸水调整到 1 L,调整 pH 至 7.4。

附 录 I
(规范性附录)
c-ELISA 溶液的配制

I.1 PBST 稀释液/洗液

0.1 mol/L PBS	50 mL
吐温-20	0.25 mL

灭菌双蒸水加至 500 mL。

I.2 底物溶液

TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺)。

I.3 终止液(1%SDS)

60 mL 双蒸水中加入 1 g SDS,边加边搅拌,溶解后定容至 100 mL。
