

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4027—2021

I 群禽腺病毒检测方法

Diagnostic methods for group I fowl adenovirus

2021-12-15 发布

2022-06-01 实施



中华人民共和国农业农村部 发布

目 次

前言	II
引言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 缩略语	1
5 临床诊断	1
5.1 流行病学	1
5.2 临床症状	2
5.3 病理变化	2
5.4 结果判定	2
6 PCR 检测	2
6.1 仪器设备和耗材	2
6.2 试剂	2
6.3 操作方法	2
6.4 结果判定	3
7 荧光 PCR 检测	3
7.1 仪器设备和耗材	3
7.2 试剂	3
7.3 操作方法	3
7.4 结果判定	4
8 IFA 鉴定	4
8.1 仪器设备和耗材	4
8.2 试剂	4
8.3 操作方法	4
8.4 结果判定	4
9 病毒分离培养	5
9.1 仪器设备和耗材	5
9.2 试剂	5
9.3 细胞和鸡胚	5
9.4 操作方法	5
9.5 结果判定	5
10 综合判定	6
附录 A(资料性) 溶液配制	7
附录 B(资料性) PCR 检测引物及判定标准图例	8
附录 C(资料性) 阳性对照病毒	9
附录 D(资料性) 荧光 PCR 检测引物及判定标准图例	10
附录 E(资料性) IFA 鉴定使用单克隆抗体及判定标准图例	11
附录 F(规范性) 细胞培养	12

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。

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、山东农业大学、中国兽医药品监察所。

本文件主要起草人：潘青、王笑梅、高玉龙、唐熠、李俊平、崔红玉、刘长军、刘爱晶、祁小乐、张艳萍、李凯、高立。

引 言

I 群禽腺病毒(group I fowl adenovirus, FAdV- I)是危害家禽养殖业的重要传染病病原,主要感染鸡、鸭、鹅等家禽,给我国家禽养殖业造成了巨大的经济损失。FAdV- I 属于腺病毒科禽腺病毒属,可分为 5 个种(A~E)和 12 个血清型(1~7, 8a~8b, 9~11),不同血清型 FAdV- I 感染家禽症状不尽相同,致病毒株感染鸡可引起包涵体肝炎(inclusion body hepatitis, IBH)、心包积液-肝炎综合征(hydropericardium-hepatitis syndrome, HHS)等病变,非致病毒株感染无典型临床症状和病理变化。我国 FAdV- I 主要流行血清型为 FAdV-4、FAdV-8a、FAdV-8b、FAdV-11,且致病血清型在不断增多,尤其 2015 年以来,我国突发流行的新型 FAdV-4 感染鸡引起的 HHS,死亡率可达 30%~100%,给养禽业带来严重的经济损失。然而,目前尚没有 FAdV- I 标准化的检测方法。基于此,特制定本文件。

本文件规定了 FAdV- I 的临床诊断、PCR 检测、荧光 PCR 检测、IFA 鉴定和病毒分离培养方法,适用于我国家禽 FAdV- I 检测的需求。

I 群禽腺病毒检测方法

1 范围

本文件规定了 I 群禽腺病毒检测的临床诊断、病毒核酸检测 (PCR 和荧光 PCR)、病毒 Hexon 蛋白检测 (IFA)、病毒分离培养的技术要求和规范。

本文件适用于 I 群禽腺病毒检测。

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)适用本文件。

- GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
- GB 19489 实验室生物安全通用要求
- NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范
- NY/T 1948 兽医实验室生物安全要求通则

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。

- CEL:鸡胚原代肝细胞(Chicken embryo liver cells)
- DNA:脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic acid)
- EB:溴化乙锭(Ethidium bromide)
- FAdV:禽腺病毒(Fowl adenovirus)
- FAdV-I: I 群禽腺病毒(Group I fowl adenovirus)
- FAdV-1:血清 1 型禽腺病毒(Fowl adenovirus serotype 1)
- FAdV-4:血清 4 型禽腺病毒(Fowl adenovirus serotype 4)
- FBS:胎牛血清(Fetal bovine serum)
- FITC:异硫氰酸荧光素(Fluorescein isothiocyanate)
- HHS:心包积液-肝炎综合征(Hydropericardium-hepatitis syndrome)
- HPS:心包积液综合征(Hydropericardium syndrome)
- IBH:包涵体肝炎(Inclusion-body hepatitis)
- IFA:间接免疫荧光(Indirect immunofluorescence assay)
- LMH:鸡肝癌细胞系(Leghorn male hepatocellular cells)
- PBS:磷酸盐缓冲液(Phosphate-buffered saline buffer)
- PCR:聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction)

5 临床诊断

5.1 流行病学

鸡、鸭、鹅等家禽对 FAdV-I 易感,野鸡、火鸡、鸽、鸵鸟等野鸟也可感染。FAdV-I 主要通过呼吸道和消化道传播,各日龄均可感染,不同血清型毒株发病率和病死率差异较大。尤其 FAdV-4 强毒株主要感染 3 周龄~7 周龄肉鸡、蛋鸡,大日龄也可感染,感染后 3 d~4 d 出现死亡高峰,死亡率可达 30%~100%。

非致病毒株呈隐性感染,无典型临床症状和病理变化。

5.2 临床症状

FAdV- I 致病毒株感染通常会出现精神沉郁,羽毛松乱,采食量下降,体重下降,排泄物呈黄色黏液状等临床症状。

5.3 病理变化

FAdV- I 致病毒株感染通常表现为肝脏肿大,边缘钝圆,表面有不同程度的出血点,部分血清型致病毒株可导致心包积液,肝细胞变性坏死,出现核内包涵体。

5.4 结果判定

符合上述 5.1、5.2、5.3 基本特征的病例,可判定为 FAdV- I 感染疑似病例。

6 PCR 检测

6.1 仪器设备和耗材

6.1.1 PCR 扩增仪。

6.1.2 台式低温高速离心机。

6.1.3 稳压稳流电泳仪和水平电泳槽。

6.1.4 凝胶成像仪(或紫外透射仪)。

6.1.5 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

6.1.6 微量可调移液器($0.1\text{ }\mu\text{L}\sim 10\text{ }\mu\text{L}$ 、 $2\text{ }\mu\text{L}\sim 20\text{ }\mu\text{L}$ 、 $10\text{ }\mu\text{L}\sim 100\text{ }\mu\text{L}$ 和 $100\text{ }\mu\text{L}\sim 1\text{ }000\text{ }\mu\text{L}$ 各 1 支)。

6.1.7 手动或电动移液装置。

6.1.8 6 孔细胞培养板。

6.1.9 吸头。

6.1.10 PCR 扩增管。

6.1.11 1.5 mL 离心管。

6.2 试剂

6.2.1 PBS,见附录 A 中的 A.1。

6.2.2 组织研磨液,见附录 A.2。

6.2.3 商品化 DNA 提取试剂盒。

6.2.4 商品化 PCR 反应试剂盒。

6.2.5 引物 FAdV- I F 和 FAdV- I R,见附录 B 中的 B.1。

6.2.6 TAE 缓冲液,见附录 A.3。

6.2.7 琼脂糖凝胶,见附录 A.4。

6.2.8 灭菌双蒸水(ddH_2O)。

6.3 操作方法

6.3.1 样品准备

取待检肝组织样品 $1.0\text{ g}\sim 2.0\text{ g}$,按照 $1:5\text{ (W/V)}$ 比例加入组织研磨液,制成混悬液,冻融 3 次。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $12\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 15 min ,取上清液, $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤器过滤,备用。

阴性对照样品为未接毒的 LMH 细胞或 CEL 细胞培养液,阳性对照样品为 HLJFAd15(见附录 C)或其他背景清楚的 FAdV- I 毒株病毒,待检样品为疑似病例肝组织悬液上清或培养病毒样品。

6.3.2 DNA 提取

按照商品化 DNA 提取试剂盒说明书提取 DNA,提取的 DNA 应立即进行 PCR 反应或 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

6.3.3 PCR 反应

见表 1。

表1 PCR反应体系(25.0 μL)

试剂	体积, μL
2×ExTaqpremix	12.5
FAdV-I F(10 $\mu\text{mol/L}$)	1.0
FAdV-I R(10 $\mu\text{mol/L}$)	1.0
DNA模板	2.0
ddH ₂ O	8.5

将PCR扩增管放入PCR扩增仪进行扩增。反应程序为:95℃预变性5 min;95℃变性30 s,58℃退火30 s,72℃延伸105 s,35个循环;72℃延伸10 min,反应结束。

6.3.4 凝胶电泳

取PCR产物5 μL 加入1.0%琼脂糖凝胶孔,在1×TAE缓冲液中进行160 V恒压电泳,15 min~20 min,在凝胶成像系统中观察结果。

6.4 结果判定

6.4.1 成立条件

阴性对照样品没有扩增出任何条带,阳性对照样品扩增出1 655 bp的条带,则试验成立(判定标准图例见B.3)。

6.4.2 结果判定

在试验成立的前提下,待检样品出现1 655 bp大小目的条带,则判定待检样品为FAdV-I核酸阳性。如需确定病毒的血清型,可进一步对扩增片段进行测序及序列分析。

待检样品无特异性条带,则判定待检样品为FAdV-I核酸阴性。

7 荧光PCR检测

7.1 仪器设备和耗材

7.1.1 荧光定量PCR仪

7.1.2 微量可调移液器(0.1 μL ~10 μL 、2 μL ~20 μL 、10 μL ~100 μL 和100 μL ~1 000 μL 各1支)。

7.1.3 吸头。

7.1.4 荧光PCR扩增管。

7.2 试剂

7.2.1 商品化荧光PCR反应试剂盒。

7.2.2 引物FAV-F和FAV-R,见附录D中的D.1。

7.2.3 标准品质粒见D.2。

7.2.4 灭菌双蒸水(ddH₂O)。

7.3 操作方法

7.3.1 样品准备

样品准备与DNA提取见6.3.1。

7.3.2 PCR反应

见表2。

表2 荧光PCR反应体系(20.0 μL)

试剂	体系, μL
2×SYBR qPCR Mix	10.0
FAV-F(10 $\mu\text{mol/L}$)	1.0
FAV-R(10 $\mu\text{mol/L}$)	1.0
DNA模板	2.0
ddH ₂ O	6.0

将 PCR 扩增管放入实时荧光定量 PCR 扩增仪进行扩增。反应程序为:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 10 s,60 °C 退火 30 s,45 个循环。试验结果用 LightCycler® 96 SW 1.1 软件进行分析。

7.4 结果判定

7.4.1 成立条件

阴性对照样品无扩增曲线或 C_t 值 >33 出现扩增曲线,标准品质粒出现特征性扩增曲线且 C_t 值 ≤ 33 ,则试验成立(判定标准图例见 D.3)。

7.4.2 结果判定

在试验成立的前提下,待检样品出现特征曲线且 C_t 值 ≤ 33 ,则判定待检样品为 FAdV-I 核酸阳性。待检样品无扩增曲线或 C_t 值 >33 出现扩增曲线,则判定待检样品为 FAdV-I 核酸阴性。

8 IFA 鉴定

8.1 仪器设备和耗材

8.1.1 荧光显微镜。

8.1.2 微量可调移液器(0.1 μL ~10 μL 、2 μL ~20 μL 、10 μL ~100 μL 和 100 μL ~1 000 μL 各 1 支)。

8.1.3 手动或电动移液装置。

8.1.4 6 孔细胞培养板。

8.1.5 吸头。

8.2 试剂

8.2.1 PBS,见附录 A.1。

8.2.2 细胞封闭液,见附录 A.5。

8.2.3 FAdV-I 群特异性单克隆抗体 5F7,见附录 E 中的 E.1。或其他 FAdV-I 群特异性单克隆抗体。

8.2.4 商品化 FITC-羊抗鼠 IgG 抗体。

8.3 操作方法

8.3.1 样品准备

阴性对照样品为未接毒的 LMH 细胞或 CEL 细胞,阳性对照样品为 HLJFAd15(见附录 C)或其他背景清楚的 FAdV-I 病毒接种的 LMH 细胞或 CEL 细胞,待检样品为病料上清液接种的 LMH 细胞或 CEL 细胞,见 6.3.1。

8.3.2 IFA 试验

8.3.2.1 将细胞培养液弃去,加入无水乙醇,每孔 0.5 mL,室温固定 20 min;弃去上清液,用 PBS 洗涤 3 次,每孔 0.5 mL,每次 5 min。

8.3.2.2 加入 1% BSA 封闭液,每孔 0.5 mL,37 °C 作用 1 h;弃去上清液,用 PBS 洗涤 3 次,每孔 0.5 mL,每次 5 min。

8.3.2.3 加入 PBS 稀释的 FAdV-I 特异性单克隆抗体(1:200),每孔 0.5 mL,37 °C 孵育 1 h;弃去上清液,用 PBS 洗涤 3 次,每孔 0.5 mL,每次 5 min。

8.3.2.4 加入 PBS 稀释的 FITC-羊抗鼠 IgG 抗体(1:200),每孔 0.5 mL,37 °C 避光孵育 1 h;弃去上清液,用 PBS 洗涤 3 次,每孔 0.5 mL,每次 5 min。

8.3.2.5 加入 PBS,每孔 0.5 mL,在荧光显微镜下观察特异性绿色荧光。

8.4 结果判定

8.4.1 成立条件

在荧光显微镜下观察,阴性对照无特异性荧光,阳性对照出现特异性荧光,则试验成立(判断标准图例见 E.2)。

8.4.2 结果判定

在试验成立的前提下,待检病毒样品出现特异性荧光,则判定待检样品为 FAdV- I 阳性。待检病毒样品无特异性荧光,则判定待检样品为 FAdV- I 阴性。

9 病毒分离培养

9.1 仪器设备和耗材

- 9.1.1 倒置显微镜。
- 9.1.2 微量组织研磨仪。
- 9.1.3 生物安全柜。
- 9.1.4 细胞培养箱。
- 9.1.5 37 °C 孵化器。
- 9.1.6 4 °C 冰箱。
- 9.1.7 -20 °C 冰箱。
- 9.1.8 微量可调移液器(0.1 μ L~10 μ L、2 μ L~20 μ L、10 μ L~100 μ L 和 100 μ L~1 000 μ L 各 1 支)。
- 9.1.9 手动或电动移液装置。
- 9.1.10 6 孔细胞培养板。
- 9.1.11 1.5 mL 离心管。
- 9.1.12 吸头。

9.2 试剂

- 9.2.1 PBS, 见附录 A 中的 A.1。
- 9.2.2 组织研磨液, 见附录 A.2。
- 9.2.3 0.25% 胰酶。
- 9.2.4 细胞培养液, 见附录 A.5。
- 9.2.5 细胞维持液(见附录 A.7)。

9.3 细胞和鸡胚

- 9.3.1 LMH 细胞系(ATCC 编号 CRL 2117)或原代 CEL 细胞,按附录 F 的规定培养。
- 9.3.2 6 日龄 SPF 鸡胚。

9.4 操作方法

9.4.1 样品准备

样品准备见 6.3.1。

9.4.2 细胞分离病毒

按附录 F 准备 LMH 或 CEL 细胞,弃去细胞培养液,用 PBS 洗涤 3 次,弃去 PBS,加入 1 mL 6.3.1 中制备的样品上清液。置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中吸附 1 h,弃去上清液,用 PBS 洗涤 3 次,弃去 PBS,加入 2 mL 细胞维持液。每日观察是否出现细胞病变(CPE),观察至 3 d~7 d。如未出现 CPE,将细胞培养物冻融 3 次,离心,取上清液盲传 3 代,观察是否出现 CPE。将出现 CPE 的细胞培养物冻融 3 次,离心,收集上清液,冷冻保存。

9.4.3 鸡胚分离病毒

画出鸡胚气室,消毒,将 6.3.1 中制备的样品上清液经卵黄囊途径接种鸡胚,每胚 0.2 mL,置 37 °C 继续孵化。每日照胚 2 次,24 h 死亡胚弃去,把 1 d~7 d 死亡鸡胚或 7 d 存活鸡胚置 2 °C~8 °C 冰箱过夜,无菌采集肝脏,按 6.3.1 制备上清液。将上清液接胚盲传 3 代,剖检。收集肝组织冷冻保存。

9.5 结果判定

细胞出现形态变圆、脱落,集聚成不规则的葡萄串状等典型病变。鸡胚出现死亡或胚体发育不良,肝

脏肿大、坏死。细胞或鸡胚出现上述病变可判定为 FAdV- I 阳性。

10 综合判定

符合 5.4 感染疑似病例,经 6.4 PCR、7.4 荧光 PCR 或 8.4 IFA 任何一项检测阳性,判定为 FAdV- I 感染。检测结果存疑时,进行 9.5 病毒分离培养,做出判定。

附录 A
(资料性)
溶液配制

A.1 磷酸盐缓冲液(PBS)的配制

称取 8.0 g 氯化钠(NaCl)、1.44 g 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、0.24 g 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、0.2 g 氯化钾(KCl)按次序溶于 900 mL 双蒸水中,混匀,调 pH 至 7.4,加双蒸水将溶液定容至 1 L,高压消毒灭菌 112 kPa 30 min,保存于 2 °C~8 °C。

A.2 组织研磨液的配制

在 99 mL PBS 中加入 1 mL 青霉素-链霉素溶液(其中,青霉素浓度为 10 000 U/mL,链霉素浓度为 10 mg/mL),混匀,保存于 2 °C~8 °C。

A.3 TAE 缓冲液的配制

称取 242 g Tris、37.2 g Na₂EDTA·2H₂O 按次序溶于 900 mL 双蒸水中,加入 57.1 mL 的醋酸搅拌,加双蒸水将溶液定容至 1 L,配制成 50×TAE 缓冲液,室温保存。使用时,取 50×TAE 缓冲液 2 mL,加入 98 mL 双蒸水,配制成 100 mL 1×TAE 缓冲液。

A.4 1%琼脂糖凝胶的配制

量取 100 mL 1×TAE 缓冲液,加入三角烧瓶,加入 1 g 琼脂糖,加热充分溶解,当温度降低至约 50 °C,加入 10 μL EB 或 EB 替代物,混匀后倒入制胶模具内,插入齿梳,等待凝胶凝固。

A.5 细胞封闭液的配制

称取 0.1 g BSA 溶于 10 mL PBS 中,混匀,配制成 1%BSA 的细胞封闭液。

A.6 细胞培养液的配制

在 89 mL DMEM 培养基中加入 10 mL FBS 和 1 mL 青霉素-链霉素溶液(其中,青霉素浓度为 10 000 U/mL,链霉素浓度为 10 mg/mL),混匀,保存于 2 °C~8 °C。

A.7 细胞维持液的配制

在 97 mL DMEM 培养基中加入 2 mL FBS 和 1 mL 青霉素-链霉素溶液(其中,青霉素浓度为 10 000 U/mL,链霉素浓度为 10 mg/mL),混匀,保存于 2 °C~8 °C。

附录 B
(资料性)

PCR 检测引物及判定标准图例

B.1 FAdV-I PCR 检测引物

见表 B.1。

表 B.1 FAdV-I PCR 检测引物

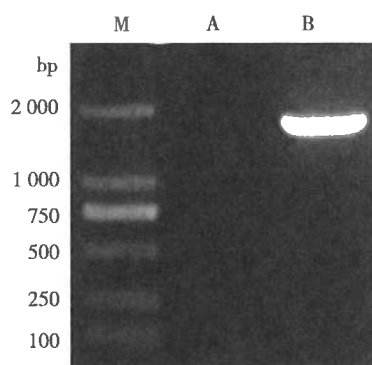
目的片段	引物名称	5'-3'的序列	在 HLJFAd15 毒株基因组中的位置	产物大小
Hexon 基因	FAdV-I F	GCCACCGGAAGCTACTTTGA	20 473~20 492	1 655 bp
	FAdV-I R	TTGTGATCCATGGGCATGA	22 109~22 127	

B.2 引物的稀释

新合成引物短暂离心(12 000 r/min, 30 s);用 DEPC 处理的灭菌双蒸水溶解,充分混匀,配置成浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的储存液, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存;使用时,将储存液用 DEPC 处理的双蒸水进行 10 倍稀释,配置成浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的引物, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

B.3 PCR 检测判定标准图例

见图 B.1。



标引序号说明:
M——Marker;
A——FAdV-I 阴性样品;
B——FAdV-I 阳性样品。

图 B.1 FAdV-I PCR 检测判定标准图例

附 录 C
(资料性)
阳性对照病毒

FAdV-4 阳性对照 HLJFAd15 毒株,由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所禽免疫抑制病创新团队于 2015 年从黑龙江省肇东市发病蛋鸡肝脏分离并鉴定保存,全基因组 Genbank 登录号为 KU991797。如有需要,可由毒株保存单位提供或惠赠。阳性对照为病毒接种 LMH 细胞 72 h 后收获,冻融 3 次,将离心收集的上清液分装,−80 °C 保存。

附录 D

(资料性)

荧光 PCR 检测引物及判定标准图例

D.1 FAdV- I 荧光 PCR 检测引物

见表 D.1。

表 D.1 FAdV- I 荧光 PCR 检测引物

目的片段	引物名称	5' - 3'的序列	产物大小
Hexon 基因	FAV-F	GTGAARCCBSTGAAVAACGACGG	227 bp
	FAV-R	AAATTGTCCCKRAANCCGATGTA	

D.2 标准品质粒

克隆 FAdV- I hexon-L1 基因的 12 个阳性标准品质粒,由山东农业大学动物科技学院制备并保存,可由山东农业大学动物科技学院提供。标准品来源毒株信息见表 D.2。

表 D.2 标准品来源毒株信息

毒株血清型	菌株保藏编号	Genbank 编号
FAdV-1	CVCC AV1	Z67970.1
FAdV-2	CVCC AV72	AF508946.1
FAdV-3	CVCC AV73	HQ697592.1
FAdV-4	CVCC AV74	AJ431719.1
FAdV-5	CVCC AV75	KC493646.1
FAdV-6	CVCC AV76	EU979372
FAdV-7	CVCC AV77	EU979373
FAdV-8a	CVCC AV78	EU979374
FAdV-8b	CVCC AV79	EU979375
FAdV-9	CVCC AV80	AF508958.2
FAdV-10	CVCC AV81	EU979377
FAdV-11	CVCC AV82	HQ697595.1

D.3 荧光 PCR 检测判定标准图例

见图 D.1。

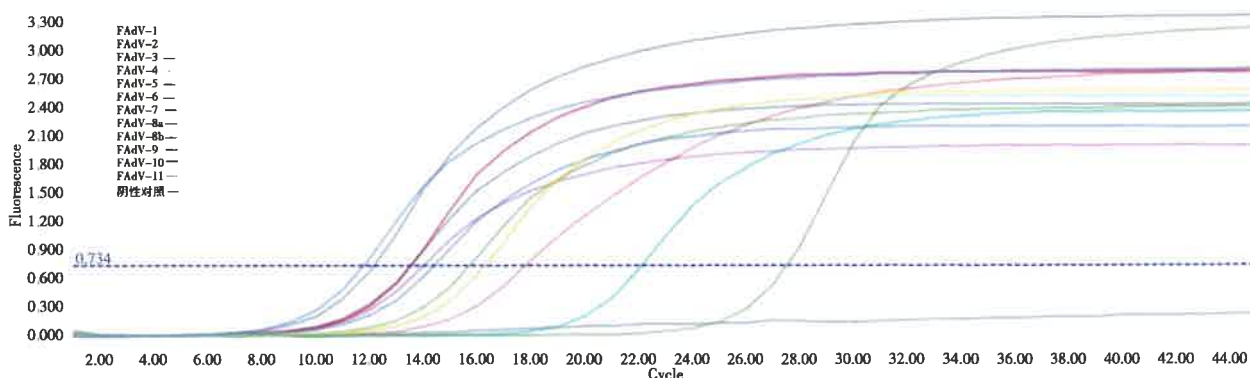


图 D.1 FAdV- I 荧光 PCR 检测判定标准图例

附录 E

(资料性)

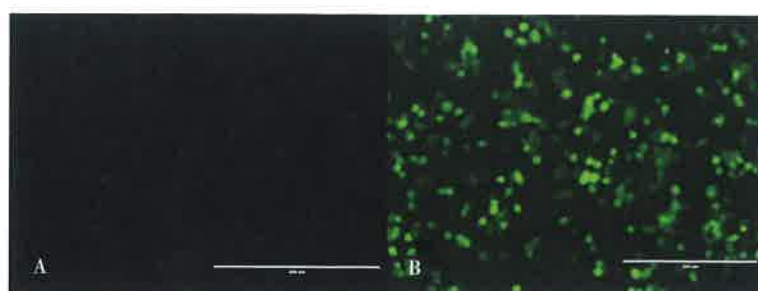
IFA 鉴定使用单克隆抗体及判定标准图例

E.1 单克隆抗体的来源

鼠源单抗 5F7(浓度:200 $\mu\text{g}/\text{mL}$;ELISA 效价 $>1:2\,430$;建议使用浓度:1:50~1:200),由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所制备并保存,该单抗可由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提供。

E.2 IFA 鉴定判定图例

见图 E.1。



标引序号说明:

A——FAdV-I 阴性样品;

B——FAdV-I 阳性样品。

图 E.1 FAdV-I IFA 鉴定判定标准图例

附录 F
(规范性)
细胞培养

F.1 鸡肝癌细胞(LMH)培养

将生长状态良好的 LMH 细胞用 PBS 洗涤 3 次, 弃去 PBS, 用 0.25% 胰酶消化为单个细胞, 加入适量的细胞培养液(见 A.6), 用吸头轻轻吹散细胞, 按每孔 1×10^6 个细胞加入 6 孔细胞培养板中(细胞传代培养则按每瓶 5×10^6 个细胞加入 T25 细胞培养瓶, 细胞长满后可进行再次传代), 置于 37°C 、5% CO_2 培养箱培养, 待细胞密度达到 90% 时用于病毒分离或接种。

F.2 鸡胚原代肝细胞(CEL)培养

取 14 日龄~17 日龄发育良好的 SPF 鸡胚, 用酒精棉消毒蛋壳气室, 无菌取出鸡胚, 仰卧打开腹膜, 取出肝脏并去除胆囊。在无菌细胞培养皿内, 用 PBS 洗涤 3 次, 将肝脏剪碎至约 1 mm^2 大小, 再用 PBS 洗涤 3 次。按每个鸡胚 4 mL 的用量加入 0.25% 胰酶, 37°C 水浴消化 20 min, 轻柔弃掉胰酶, 加入 PBS 洗涤 1 次, 再加入适量细胞培养液(见 A.6)吹打分散, 用 8 层无菌纱布过滤组织残渣, 收集过滤后的细胞液, $1\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 离心 8 min, 最后弃掉上清液, 用适量的细胞培养液重悬细胞沉淀, 按每孔 1×10^6 个细胞加入 6 孔细胞培养板中, 置于 37°C 、5% CO_2 培养箱培养, 待细胞密度达到 90% 时用于病毒分离或接种。

中华人民共和国
农业行业标准
I 群禽腺病毒检测方法
NY/T 4027—2021

* * *

中国农业出版社出版
(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)

(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)

北京科印技术咨询服务股份有限公司印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 1.25 字数 25 千字

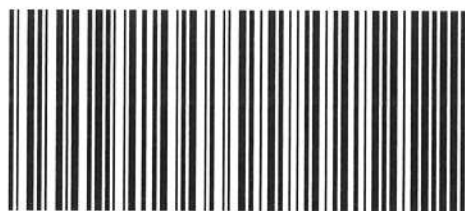
2022 年 4 月第 1 版 2022 年 4 月北京第 1 次印刷

书号: 16109·8925

定价: 42.00 元

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261



NY/T 4027—2021