

3304 禽网状内皮组织增生症病毒检验法

1 细胞制备 按附录 3504 制备鸡胚成纤维细胞 (CEF)。

2 样品的处理及接种

2.1 样品的处理 同附录 3302 禽白血病病毒检验法。

2.2 接种与培养 处理好的样品接种 1 个 25 cm² 左右的 CEF 单层, 置 37℃ 吸附 60 分钟, 弃去接种液, 用含 3% 牛血清的 M-199 培养液洗 CEF 单层 2 次, 2.0 ml/次, 每瓶细胞加 7.0~8.0 ml 含 3% 牛血清的 M-199 培养液, 37℃ 培养 5~7 日。同时设立正常细胞作阴性对照。

3 病毒对照 将鸡网状内皮组织增生症病毒 (REV) 稀释至 10 TCID₅₀/ml, 取 1.0 ml 接种至 CEF 作为阳性对照。

4 细胞培养的传代 细胞培养 5~7 日后, 按常规方法消化、收获细胞, 将其中 1/10 的细胞用 2.0 ml 含 3% 牛血清的 M-199 细胞培养液悬浮, 接种 4 孔 48 孔板, 每孔接种 0.5 ml。剩余细胞置 -15℃ 以下保存备用。接种细胞的 48 孔板置 5% CO₂, 37℃ 培养 5~7 日, 然后进行荧光染色。

5 荧光染色

5.1 固定 弃去 48 孔板的细胞培养液, 每孔约加 0.5 ml PBS (pH 7.2, 下同) 轻洗细胞表面 1 次, 尽量弃尽 PBS, 然后每孔加入 0.3 ml 冷甲醇, 置室温固定 10~15 分钟, 弃去甲醇, 自然晾干 2~5 分钟。

5.2 加一抗 (鸡 REV 特异性抗体或 REV 单克隆抗体 2A2) 自然晾干后, 用 PBS 洗细胞面 1 次, 然后每孔加入 0.1 ml 用 PBS (pH 7.2~7.4) 进行适当稀释的鸡 REV 特异性抗体一抗, 置 37℃ 作用 1 小时。

5.3 洗涤 弃去鸡 REV 特异性抗体一抗, 先用含 0.05% 吐温-20 的 PBS 洗 3 次, 每次每孔加入洗液 0.5 ml, 轻微振荡洗涤 1 分钟。然后用 PBS 以同样的方法洗 2 次。

5.4 荧光二抗 (FITC 标记的兔抗鸡 IgG 或 FITC 标记的羊抗鼠 IgG) 染色 尽量弃尽洗液, 每孔加入 0.1 ml 用 PBS 进行适当稀释的 FITC 标记的兔抗鸡 IgG 二抗, 置 37℃ 作用 1 小时。

5.5 洗涤 方法同 5.3。

6 观察 在倒置荧光显微镜下用蓝色激发光 (波长 490 nm) 观察。被感染的 CEF 细胞呈现绿色荧光, 有完整的细胞形态, 周围未被感染的细胞不着色, 视野发暗。

7 结果判定

7.1 当阳性对照接种的 4 个孔中全部出现特异性绿色荧光, 阴性对照接种孔均未出现特异性绿色荧光时, 检验结果成立。

7.2 被检样品接种的 4 个孔中, 只要有 1 孔出现特异性绿色荧光, 即判定该样品中 REV 阳性。