ICS 11.220
B 41

中华人民共和国国家标准

GB/T 26436—2010

禽白血病诊断技术

Diagnostic techniques for avian leukosis

2011-01-14 发布　　2011-07-01 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

本标准的附录 A、附录 B、附录 C、附录 D、附录 E、附录 F 为规范性附录，附录 G、附录 H 为资料性附录。

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(SC/TC 181)归口。

本标准起草单位：山东农业大学、中华人民共和国珠海出入境检验检疫局、华南农业大学。

本标准主要起草人：崔治中、孙淑红、赵鹏、杨素、沙才华、廖明、曹伟胜。

引　　言

禽白血病病毒(avian leukosis viruses;ALV)为反转录病毒科的 α 反转录病毒属,可诱发鸡不同组织的良性和恶性肿瘤,是鸡群中除马立克氏病病毒(MDV)和禽网状内皮增生症病毒(REV)外的又一类重要的致肿瘤病毒。

禽白血病是一类由 ALV 相关的反转录病毒引起鸡的不同组织良性和恶性肿瘤病的总称。随发生肿瘤的主要细胞成分不同,分别称之为不同名称的肿瘤。ALV 可分为 A～J 10 个亚群,其中仅 A 亚群、B 亚群、C 亚群、D 亚群、E 亚群、J 亚群病毒与鸡相关。A 亚群、B 亚群、C 亚群、D 亚群、J 亚群属外源性 ALV,与禽白血病的不同类型肿瘤发病相关。E 亚群病毒基因组可完整地整合进感染鸡的染色体基因组并稳定地遗传下去,也可从中再复制出传染性病毒颗粒,因而称之为内源性病毒。此外,在一些鸡的染色体的不同部位,还可能带有一些 ALV 的基因组片段。E 亚群 ALV 的致病性很低或没有致病性,不属于净化对象,但很多鸡群中包括一些无特定病原(SPF)鸡群都可能带有 E 亚群内源性 ALV,它的感染不会给鸡群带来不良影响,但会干扰检测。

目前,该病对我国养鸡业的危害很大。在国际种禽贸易中,外源性白血病病毒感染是最主要的检测对象之一。

禽白血病诊断技术

1 范围

本标准规定了病料中ALV特异血清抗体和外源性ALV的检测方法。

本标准适用于判断鸡群或病料中是否有外源性ALV感染。

2 临床症状和病理变化

ALV主要引起感染鸡在性成熟前后发生肿瘤死亡，感染率和发病死亡率高低不等，死亡率最高可达20%。一些鸡感染后虽不发生肿瘤，但可造成产蛋性能下降甚至免疫抑制。

淋巴样白血病是最为常见的经典型白血病肿瘤，肿瘤可见于肝、脾、法氏囊、肾、肺、性腺、心、骨髓等器官组织，肿瘤可表现为较大的结节状(块状或米粒状)，或弥漫性分布细小结节。肿瘤结节的大小和数量差异很大，表面平滑，切开后呈灰白色至奶酪色，但很少有坏死区。在成红细胞性白血病、成髓性细胞白血病、髓细胞白血病中，多使肝、脾、肾呈弥漫性增大。J亚群ALV感染主要诱发髓细胞样肿瘤，它最常见的特征性变化主要为肝脾肿大或布满无数的针尖、针头大小的白色增生性肿瘤结节。在一些病例中，还可能在胸骨和肋骨表面出现肿瘤结节。

单纯苏木精伊红染色(H.E染色)的病理组织切片观察在诊断上有一定参考意义。在表现为淋巴样细胞肿瘤结节时，要注意与马立克氏病病毒(MDV)和禽网状内皮增生症病毒(REV)诱发的肿瘤相区别；在表现为髓样细胞瘤时，既要与REV诱发的类似肿瘤细胞相区别，也要与嗜中性白细胞浸润性炎症相区别，如鸡戊型肝炎病毒感染引起的肝局部炎症。最终的鉴别诊断以肿瘤组织中的病毒抗原检测或病毒分离鉴定为最可靠依据。

3 病毒的分离培养、检测和鉴定

3.1 试剂和仪器

3.1.1 试剂

DMEM液体培养基(pH7.2)、0.25%胰酶、磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L PBS，pH7.2)、抽提缓冲液、青霉素(10万U/mL)、链霉素(10万U/mL)、抗ALV单抗、抗ALV单因子鸡血清、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的山羊抗小鼠IgG抗体、ALV-p27抗原酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒、聚合酶链反应(PCR)试剂、RT-PCR试剂、生理盐水(0.9%氯化钠)、无水乙醇(分析纯)、丙酮(分析纯)、甘油(分析纯)、75%酒精、碘酒、细胞生长液(含有5%胎牛血清或小牛血清的DMEM液体培养基)、细胞维持液(含有1%胎牛血清或小牛血清的DMEM液体培养基)、大肠杆菌(TG1)、蛋白酶K、70%冷乙醇、乙酸钠(分析纯)、三氯甲烷(分析纯)、异戊醇(分析纯)、异丙醇(分析纯)、10×加样缓冲液、琼脂糖、DL2000 DNA Marker、TAE电泳缓冲液、氯化钙(0.1 mol/L)、氨苄青霉素(100 μg/μL)、双蒸水、LB液体培养基、TE缓冲液、RNase、细胞裂解液、0.1%的DEPC(焦碳酸乙二酯)水等(除特殊说明外，上述试剂均为分析纯)。

3.1.2 仪器

锥形瓶、荧光显微镜、恒温培养箱，冰冻台式离心机(≥12 000 r/min)、−20 ℃冰箱、−80 ℃冰箱、

Eppendorf 管(离心管)、棉棒、载玻片、盖玻片、细胞培养平皿、37 ℃数显恒温水浴锅、37 ℃摇床、96 孔培养板、SPF 隔离器、紫外光凝胶成像分析仪、微量移液器、低温恒温水槽(16 ℃)、吸水纸。

3.2 分离病毒用细胞

3.2.1 鸡胚成纤维细胞(CEF)

鸡胚成纤维细胞制备方法见附录 A。

3.2.2 鸡胚成纤维细胞自发永生株(DF1)细胞

DF1 细胞培养基制备方法见附录 B。

3.3 病料的采集与处理

3.3.1 全血、血清或血浆

取疑似病鸡的全血、带有白血细胞的血浆或血清,无菌接种于长成单层的 CEF 或 DF1,置于含 5% 二氧化碳的 37 ℃恒温培养箱中培养。

3.3.2 脏器

采集疑似病鸡的脾脏、肝脏、肾脏,按脏器质量的 1 倍~2 倍加入灭菌生理盐水(含青霉素和链霉素各 1 000 IU/mL)研磨,直至成匀浆液。将悬液移至离心管中充分摇振后,4 ℃,10 000 r/min 离心 5 min,收集上清液。按 3.4.1.1 中的方法接种培养或—70 ℃保存备用。

3.3.3 疫苗样品

疫苗样品处理后接种 CEF 培养扩增病毒。但为了鉴别是否是外源性 ALV,应接种 DF1 细胞或其他抗 E 亚群白血病鸡细胞(C/E)鸡来源的细胞。

3.3.4 咽喉、泄殖腔棉拭子

取咽喉棉拭子时,将棉拭子深入喉头口及上颚裂来回刮 3 次~5 次取咽喉分泌液;取泄殖腔棉拭子时,将棉拭子深入泄殖腔转 3 圈并沾取少量粪便;将棉拭子头一并放入盛有 1.5 mL 磷酸盐缓冲液的无菌离心管中(含青霉素和链霉素各 1 000 IU/mL),盖上管盖并编号,10 000 r/min 离心 5 min 后取上清备用。

3.4 病毒的分离培养与鉴定

3.4.1 病毒的分离培养

3.4.1.1 接种培养:病料接种细胞单层后,置于 37 ℃培养箱中培养 2 h。然后吸去细胞生长液,换入细胞维持液,继续培养 5 d~7 d。

3.4.1.2 细胞传代:将 3.4.1.1 培养的细胞传代于加有盖玻片的平皿中,培养 5 d~7 d。

3.4.2 病毒的鉴定

3.4.2.1 间接免疫荧光抗体反应(IFA)

3.4.2.1.1 固定

将盖玻片上的单层细胞,在自然干燥后滴加丙酮-乙醇(6∶4)混合液室温固定 5 min,待其自然干

燥，用于 IFA，或置于－20 ℃保存备用。设未感染的细胞单层为阴性对照。

3.4.2.1.2 加第一抗体

用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液（pH7.4）将单克隆抗体（如抗 ALV-J 亚群特异性单克隆抗体）或抗 ALV 单因子鸡血清（抗 ALV 单因子鸡血清的制备见附录 C）稀释到工作浓度，在 37 ℃水浴箱作用 40 min，然后用磷酸盐缓冲液洗涤 3 次。

3.4.2.1.3 加 FITC 标记二抗

按商品说明书用磷酸盐缓冲液稀释 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体或山羊抗鸡 IgY 抗体（当第一抗体为 ALV 特异性单克隆抗体，选用 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体作为第二抗体；当第一抗体为鸡抗 ALV 单因子血清，则选用 FITC 标记的山羊抗鸡 IgY 抗体作为第二抗体）。37 ℃水浴箱作用 40 min，用磷酸盐缓冲液洗涤 3 次。

3.4.2.1.4 加甘油

滴加少量 50%甘油磷酸盐缓冲液于载玻片上，将盖玻片上的样品倒扣其上。在荧光显微镜下观察。

3.4.2.1.5 结果观察与判定

被感染的 CEF 细胞内呈现亮绿色荧光，周围未被感染的细胞不被着色或颜色很淡。在放大 200×～400×时，可见被感染细胞胞浆着色，判为 ALV 阳性，无亮绿色荧光者判为阴性。

3.4.2.2 ALV-p27 抗原 ELISA 检测

3.4.2.2.1 抗原样本制备

将病料同 3.4.1.1 和 3.4.1.2 所述方法接种细胞，培养 7 d～14 d 后取上清液直接检测；也可取细胞培养物冻融后检测；或用从泄殖腔采集的棉拭子。

3.4.2.2.2 p27 抗原 ELISA 检测

ALV-p27 抗原可用商品试剂盒检测，对不同来源的样品，按厂家的说明书操作。当样本在 DF1 细胞或 CEF（C/E 品系）上检测出 ALV-p27 抗原时，判为外源性 ALV 阳性，否则判为阴性。直接用泄殖腔棉拭子样品检测出 p27，说明有 ALV，但不能严格区分外源性或内源性。

3.5 ALV 亚群鉴定

3.5.1 利用 J 亚群 ALV 特异性单克隆抗体进行 IFA 检测，可以鉴定 J 亚群 ALV，但不能鉴别其他 ALV 亚群如 A 亚群、B 亚群、C 亚群、D 亚群。

3.5.2 对分离到的病毒用 RT-PCR（上清液中的游离病毒）或 PCR（细胞中的前病毒 cDNA）扩增和克隆囊膜蛋白 gp85 基因，测序后与基因序列数据库（GeneBank）中的已知 A 亚群、B 亚群、C 亚群、D 亚群的 gp85 基因序列做同源性比较，即可对病毒进行分群。ALV 病毒分群方法见附录 D。

3.6 荧光定量 PCR 扩增 ALV-J

该方法适用于鸡群的检疫或 ALV-J 感染的净化，可在较短时间内完成大量样品的特异性检测。血浆或泄殖腔棉拭子样品可直接用于检测，见附录 E。

4 血清特异性抗体的检测

4.1 仪器和试剂

4.1.1 试剂:磷酸盐缓冲液洗液、禽白血病抗体 ELISA 检测试剂盒、FITC 标记的山羊抗鸡 IgY 抗体、甘油。

4.1.2 仪器:酶标仪、荧光显微镜、37 ℃恒温培养箱。

4.2 样品的采集

样品的采集见 3.3。

4.3 抗体的检测

4.3.1 ELISA 检测

可选用禽白血病 A 亚群、B 亚群及 J 亚群抗体 ELISA 检测试剂盒,严格按商品提供的说明书操作和判定。

4.3.2 IFA 检测

4.3.2.1 抗原

抗原制备方法见附录 F。

4.3.2.2 操作步骤

在相应的盖玻片上或抗原孔中加入用磷酸盐缓冲液(1∶50)稀释的待检鸡血清,在 37 ℃下作用 40 min,用磷酸盐缓冲液洗涤三次。再加入工作浓度的 FITC 标记的山羊抗鸡 IgY 抗体(第二抗体),在 37 ℃作用 40 min,用磷酸盐缓冲液洗涤 3 次,加少量 50%甘油磷酸盐缓冲液后在荧光显微镜下观察。

4.3.2.3 结果的判定

结果的判定方法同 3.4.2.1.5。不论是商品鸡群还是 SPF 鸡群,只要检出 A 亚群、B 亚群及 J 亚群抗体阳性的鸡,就表明该群体曾经有过外源性 ALV 感染。

附 录 A
（规范性附录）
O系SPF鸡胚成纤维细胞(CEF)的制备

选择9日龄～10日龄发育良好的SPF鸡胚。先用碘酒棉再用酒精棉消毒蛋壳气室部位，无菌取出鸡胚，去头、四肢和内脏，放入灭菌的玻璃器皿内，用无血清的DMEM液洗涤胚体。用灭菌的剪刀剪成米粒大的小组织块，再用无血清的DMEM液洗2次～3次，然后加0.25%胰酶溶液（每个鸡胚约加1 mL），在37.5 ℃～38.5 ℃水浴中消化10 min～15 min。吸出胰酶溶液消化产生的悬液，再加入适量的营养液（用无血清的DMEM液，加青霉素、链霉素200 IU/mL～500 IU/mL）吹打，用4层纱布滤过。取少量过滤后的细胞悬液做细胞计数，其余在1 000 r/min下离心5 min。将细胞沉淀再混悬于细胞培养液中，制成每毫升含活细胞数约100万～150万的细胞悬液，分装于培养瓶(皿)中，进行培养，形成单层后备用（一般在24 h内应用）。

附 录 B
（规范性附录）
DF1 细胞培养基配制

B.1 商品化的 DMEM 液，pH7.2，加 5%胎牛血清。青霉素、链霉素：各 250 IU/mL。

B.2 培养条件：37 ℃，5%二氧化碳。

附 录 C
(规范性附录)
抗 ALV 单因子鸡血清的制备

选择经鉴定无任何其他潜在病毒的 ALV 参考株作为种毒(如经 ALV-J 全基因组 cDNA 克隆质粒 DNA 转染 SPF 鸡的 CEF 所产生的分子克隆化 ALV),接种 C/E CEF 后复制和扩增病毒。病毒接种 CEF 继续培养 5 d 后,再传代一次。将传代长成单层的 CEF 换成含 1%小牛血清的 DMEM 维持液,继续培养 72 h~96 h 后收取上清液(通常可达到最高病毒效价),分装在离心管中,每支 1 mL,于 −70 ℃ 冰箱保存。2 d~3 d 后,取出一支,用细胞培养液作 10 倍系列稀释后,分别接种于含有新鲜配制的 CEF 单层(细胞覆盖面应 70%)96 孔培养板上,每个稀释度 8 孔。在 37 ℃下培养 6 d 后,弃上清液,用磷酸盐缓冲液洗一次后,加入预冷的丙酮-乙醇(6∶4)固定。待自然干燥后,用抗 ALV-J 的单克隆抗体进行 IFA(见 3.5),以 IFA 的结果来判定病毒感染的终点,测定其中 ALV 的组织细胞半数感染量($TCID_{50}$)。

选用 6 周龄以上 SPF 鸡,SPF 隔离器饲养。每只鸡皮下接种 10^4 个 $TCID_{50}$ 的 ALV 悬液。4 周~6 周后采集血清。IFA 抗体滴度应≥1∶100。

附　录　D
（规范性附录）
ALV 亚群鉴定程序

D.1　克隆载体和宿主菌

商品化的 PCR 产物克隆载体质粒，或其他类似载体质粒。可用多种大肠杆菌作为宿主菌，如 TG1 等。

D.2　病毒模板的制备

按照以下程序或商品化提取细胞 DNA 试剂盒的说明书提取细胞 DNA。

1）　接种病毒的细胞经磷酸盐缓冲液洗涤 3 次，加入适量 0.25% 胰酶，37 ℃温箱中放置 5 min～10 min，将细胞消化吹打后收集于 1.5 mL 离心管中。

2）　2 000 r/min 离心收获细胞，然后加入 500 μL 抽提缓冲液（100 mmol/L 氯化钠，10 mmol/L Tris.Cl pH8.0，25 mmol/L EDTA pH8.0，0.5% SDS）悬浮后，加入 5 μL 蛋白酶 K（100 μg/mL），56 ℃水浴中消化 5 h。

3）　加入等体积的苯酚-三氯甲烷溶液（苯酚：三氯甲烷：异戊醇＝25：24：1）约 500 μL 抽提一次，将上层液体转移到另一 1.5 mL 离心管中，加入 1/10 体积 3 mol/L 的乙酸钠和 2 倍体积无水乙醇后，置于－20 ℃冷却 2 h 或者更长时间。

4）　取出后 12 000 r/min 离心 10 min 沉淀 DNA，弃去上清液。再小心加入 70% 冷乙醇轻洗 DNA 沉淀，弃去上清液。

5）　经乙醇沉淀后的 DNA，空气中室温自然干燥后，溶解于 50 μL 双蒸水中，即为模板 DNA。

D.3　囊膜蛋白 *env* 基因的扩增

D.3.1　引物

可根据已发表资料合成扩增 ALV-J 的前病毒 DNA 特异性 PCR 引物，本例示范引物为：

正向引物：5′-CTTGCTGCCATCGAGAGGTTACT-3′，相当于 ALV-J 原型毒株 HPRS-103 前病毒基因组 DNA 序列的第 5394 对～第 5416 对碱基。

反向引物：5′-AGTTGTCAGGGAATCGAC-3′，相当于 ALV-J 原型毒株 HPRS-103 前病毒基因组 DNA 序列的第 7811 对～第 7794 对碱基。

引物用双蒸水稀释为 25 pmol/μL，－20 ℃保存备用。

D.3.2　PCR

以第 D.2 章中提取的细胞 DNA 为模板，扩增 ALV-J 的囊膜蛋白基因（*env*）特异性 2.2 kb 条带，其 PCR 反应体系（50 μL）见表 D.1。

表 D.1 ALV-J *env* 基因 PCR 反应体系

组　　分	体积/μL
双蒸水	30.5
10×缓冲液(无 Mg^{2+})(成分:100 mmol/L Tris.Cl pH8.0,500 mmol/L 氯化钾,1%明胶)	5
氯化镁(15 mmol/L)	4
dNTPs(2.5 mmol/L)	4
正向引物(25 pmol/μL)	2
反向引物(25 pmol/μL)	2
DNA 聚合酶(5 U/μL)	0.5
模板 DNA(约 100 ng/μL)	2
总体积	50

将上述成分分别加入灭菌的 PCR 管中,轻轻混和均匀,离心后置于 PCR 扩增仪。按照以下扩增程序进行反应:

首轮循环:95 ℃5 min,50 ℃1 min,72 ℃1 min;

中间循环:95 ℃1 min,50 ℃1 min,72 ℃2 min30 s,进行 30 个循环;

72 ℃延伸 10 min;4 ℃保存。

D.3.3 PCR 产物 DNA 电泳

用微量移液器取 4.5 μL PCR 产物加入 0.5 μL 的 10×进样缓冲液(0.25%溴酚蓝,0.25%二甲苯苯胺,15%聚蔗糖 400),在浓度为 0.8%的琼脂糖凝胶上进行电泳,同时在另一加样孔加入 5 μL DL2000 DNA Marker。在 TAE 电泳缓冲液中,90 V 电压,电泳 50 min 后,于紫外光凝胶成像分析系统中观察并记录结果。

D.3.4 PCR 产物的回收与定量

可采用商品化 PCR 产物回收试剂盒进行回收。

1) 将病毒 *env* 基因的 PCR 产物在 0.8%的琼脂糖凝胶上进行电泳,90 V 电压,电泳 50 min。
2) 将目的条带切割下来,置于已经称重的 1.5 mL 离心管中。
3) 再次称重,计算含目的条带的凝胶块的质量。
4) 按每毫克加入 100 μL Ultra Salt,在 55 ℃～65 ℃水浴锅中使琼脂糖凝胶融化。
5) 加入 5 μL Glass Milk,混匀后室温下放置 5 min。
6) 12 000 r/min 离心,去掉上清液。
7) 加入 1 mL Ultra Wash 洗涤沉淀。
8) 12 000 r/min 离心,去掉上清液。再次离心,用微量移液器吸出剩余液体。
9) 干燥后,加入 15 μL 双蒸水,用微量移液器吹打混匀后,室温下放置 5 min,12 000 r/min 离心,将上清液转移至另一离心管中。
10) 取 1 μL 回收产物在 0.8%的琼脂糖凝胶上进行电泳,另加 5 μL DL2000 DNA Marker,用以估计回收 DNA 的浓度。

D.4 PCR 产物的克隆

D.4.1 连接反应

将载体与纯化回收 PCR 产物于 16 ℃下连接 6 h～8 h。

连接体系为：

载体	25 ng
纯化 *env* 基因 PCR 产物	100 ng
溶液Ⅰ	5 μL
加双蒸水至	10 μL

D.4.2 质粒转化用感受态大肠杆菌的制备

用氯化钙法制备大肠杆菌 TG1 菌株的感受态细胞，步骤简述如下：

1) 一个盛约 50 mLLB 液体培养基的锥形瓶，接种大肠杆菌 TG1 菌株，在 37 ℃恒温振荡器中振荡培养至半浑浊半透明状态。
2) 在无菌条件下将细菌转移到一个无菌的－20 ℃保存的 50 mL 离心管中，冰上放置 10 min，使培养物冷却至 0 ℃。
3) 4 ℃以 4 000 r/min 离心 10 min，回收细菌细胞。
4) 倒出上清液，将管倒置 1 min，以使残余的培养液流尽。
5) 用 10 mL 用冰预冷的 0.1 mol/L 氯化钙重悬每份沉淀，冰浴上放置 30 min。
6) 4 ℃以 4 000 r/min 离心 10 min，回收细菌细胞。
7) 倒出上清液，将管倒置 1 min，以使残余的培养液流尽。
8) 每 50 mL 初始培养物用 1 mL 用冰预冷的 0.1 mol/L 氯化钙重悬每份沉淀，4 ℃保存备用。

D.4.3 质粒的转化

将 D.4.1 中得到的连接产物转化大肠杆菌，步骤简述如下：

1) 10 μL 连接产物加入 200 μL 新鲜制备的 TG1 感受态细胞中，混匀内容物，冰浴上放置 30 min。
2) 放入 42 ℃循环水浴中，准确热激 90 s。
3) 快速转移到冰浴中，使之冷却 2 min～3 min。
4) 每管加 LB 培养基 800 μL，在 37 ℃摇床上（转速不超过 225 r/min），温育 45 min，使细菌复苏。
5) 取 200 μL 菌液均匀涂布到含有 100 μg/μL 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上。
6) 将平板置于 37 ℃温箱中培养 12 h，挑取单个菌落培养后，进行质粒 DNA 的制备与鉴定。

D.5 质粒 DNA 的提取和鉴定

D.5.1 质粒 DNA 的提取

挑选平板上的白色菌落，接种至氨苄青霉素浓度为 50 μg/mL 的 5 mL LB 液体培养基中，于 37 ℃摇床上振荡培养 6 h，提取质粒。

1) 菌体的收集：
   a) 将培养液倒入 1.5 mL 离心管中，12 000 r/min，离心 1 min，倒掉上清液。
   b) 用 1 mL TE 缓冲液悬浮菌体沉淀，再离心回收菌体。

2) 将沉淀悬浮于100 μL用冰预冷的溶液Ⅰ，在振荡器上强烈振荡混匀。

3) 加200 μL溶液Ⅱ（不超过5 min，溶液Ⅱ需现配），颠倒5次（不要强烈振荡），冰浴中放置3 min。

4) 加150 μL溶液Ⅲ，温和振荡10 s，冰浴中放置3 min～5 min。

5) 12 000 r/min离心5 min，将上清液转移至另一离心管中，加入等体积的苯酚-三氯甲烷，在振荡器上振荡混匀。

6) 12 000 r/min离心5 min，将上清液转移至另一离心管中，加入2倍体积的无水乙醇。

7) 12 000 r/min离心10 min～15 min，用1 mL70%乙醇漂洗沉淀，干燥DNA沉淀。

8) 用50 μL双蒸水或TE缓冲液溶解沉淀，同时加入0.5 μL～1 μL RNase。－20 ℃保存备用。

D.5.2 重组质粒DNA的酶切鉴定

质粒以EcoR Ⅰ和Hind Ⅲ这两种酶进行双酶切鉴定。

酶切体系如下：

总体积	20 μL
质粒DNA	10 μL
双蒸水	7 μL
10×缓冲液K	2 μL
EcoR Ⅰ	0.5 μL
Hind Ⅲ	0.5 μL

以上组分混匀后，轻微离心，37 ℃ 酶切2 h。于0.8%的琼脂糖凝胶中90 V电泳45 min，在凝胶成像系统下观察并记录结果。

D.6 克隆序列的测定

将上一步经EcoR Ⅰ和Hind Ⅲ双酶切鉴定的阳性克隆测序。所得序列与GeneBank中发布的ALV的A亚群、B亚群、C亚群、D亚群、E亚群和J亚群的囊膜蛋白gp85基因做同源性比较分析，并确定属于哪个亚型。可参考的GeneBank中序列编号分别为：M37980和DQ365814（A亚型）；AF052428(B亚型)；J02342（C亚型）；D10652（D亚型）；M12172、EF467236和AY013303（E亚型）；Z46390、AF247391、DQ115805、AY897219和EU264064(J亚型)。对于A亚群、B亚群、C亚群、D亚群和E亚群，核苷酸或氨基酸的同源性应分别大于90%，与哪个参考亚型的同源性最高，即确定是这个亚型。对于J亚群，应与大多数已知J亚群序列的同源性大于80%。

附 录 E
（规范性附录）
荧光定量 PCR 扩增 ALV-J

E.1 试剂

引物和探针序列：

选择 ALV-J 特异性 *env* 基因序列作为 ALV-J 检测的靶序列，产物长度为 138 bp。

上游引物：5′ AGAAAGACCCGGAGAAGAC 3′；

下游引物：5′ ACACGTTTCCTGGTTGTT 3′；

*Taq*Man 探针：5′ ATTTCCGTTGTCCCAGGGGTGG 3′，其 5′端和 3′端分别标记 FAM 和 BHQ。

E.2 样品采样和前处理

样品采样和前处理见 3.3。

E.3 核酸抽提及荧光定量 PCR 检测

E.3.1 注意事项

实验室注意事项参见附录 G。

E.3.2 核酸抽提

1) 取 *n* 个灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管编号（*n* 为被检样品与阴性对照、阳性对照之和）。
2) 每管加入 600 μL 细胞裂解液，分别加入被检样本、阴性对照、阳性对照各 200 μL，再加入 200 μL 三氯甲烷，混匀器上振荡混匀 5 s（不能过于强烈，以免产生乳化层，也可以用手颠倒混匀）。于 4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min。
3) 取与 E.3.2 的 1）相同数量灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管，加入 400 μL 异丙醇（−20 ℃ 预冷），做标记。吸取 E.3.2 的 1）各管中的上清液转移至相应的管中，上清液应至少吸取 500 μL，尽量避免吸出中间层，颠倒混匀。
4) 于 4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min（Eppendorf 管开口保持朝离心机转轴方向放置），小心倒去上清液，倒置于吸水纸上，沾干液体（不同样品需在吸水纸不同地方沾干）；加入 600 μL75％乙醇，颠倒洗涤。
5) 于 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min（Eppendorf 管开口保持朝离心机转轴方向放置），小心倒去上清液，倒置于吸水纸上，尽量沾干液体（不同样品需在吸水纸不同地方沾干）。
6) 4 000 r/min 离心 10 s（Eppendorf 管开口保持朝离心机转轴方向放置），将管壁上的残余液体甩到管底部，小心倒去上清液，用微量加样器将其吸干，吸头不要碰到有沉淀一面，室温下干燥 5 min～10 min。
7) 加入 15 μL DEPC（焦碳酸乙二酯）水，溶解管壁上的 RNA，5 000 r/min 离心 5 s，冰上保存备用。若需长期保存则需放置在−70 ℃冰箱。

E.3.3 扩增检测

E.3.3.1 扩增试剂准备

在反应混合物配制区进行。

取出J亚群禽白血病病毒一步法荧光定量RT-PCR检测试剂盒(参见附录H),在室温下融化后,6 000 r/min离心5 s,每个PCR反应按表E.1所示用量配制PCR反应混合液(需配制反应液数量=样本个数+阴性对照+阳性对照+1)。

表 E.1 PCR反应体系

试　　剂	用量/μL
RT-PCR反应液	14.5
Taq 酶(5 U/μL)	0.25
逆转录酶	0.25

将以上PCR反应试剂按使用量吸取到一个离心管中,充分混匀,然后在每个PCR管中分装15 μL,转移至样本处理区。

E.3.3.2 加样

在已分装有PCR反应混合液的PCR管中分别加入已提取好的核酸10 μL,盖上管盖,将PCR管放入荧光PCR检测仪内,记录样本放置顺序。

E.3.3.3 PCR扩增检测

在扩增检测区进行。

E.3.3.4 反应条件

第一步:42 ℃ 30 min,95 ℃ 5 min;
第二步:95 ℃ 10 s,55 ℃ 10 s,72 ℃ 30 s,5个循环;
第三步:95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,40个循环;
60 ℃时设置采集荧光。

E.3.3.5 荧光素设定

报告基团(report dye)设定为FAM,淬灭基团(quench dye)设定为BHQ(或Tamra或Eclipse),参考标记物(reference dye)设定为None。

E.4 分析条件设定及结果判定

E.4.1 质控标准

E.4.1.1 综合分析仪器给出的各项结果,基线(baseline)以仪器给出的默认值作为参考,阈值(threshold)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为准,具体根据仪器噪音情况进行调整,选择FAM通道进行分析。

E.4.1.2 ALV-J阳性对照和阴性对照质控标准:阳性对照有S型PCR扩增曲线,而且*Ct*值(每个反应管内的荧光信号量达到设定的阈值时所经历的循环数)≤30;阴性对照无S型PCR扩增曲线,且*Ct*

值为无。否则此次试验结果无效。

E.4.2 结果判定及描述

E.4.2.1 有S型PCR扩增曲线，且 Ct 值≤30的样本为阳性，表明ALV-J核酸阳性。无S型PCR扩增曲线，且 Ct 值为无的样本为阴性样本，表明ALV-J核酸阴性。

E.4.2.2 对于 $30<Ct$ 值 <40 的样本建议对样品进行复检。若复检后，Ct 值 <40，判为ALV-J核酸阳性，否则判为阴性。样品中ALV-J核酸阳性，表明相应样品中检出该病毒，相应鸡有ALV-J感染。

附 录 F
（规范性附录）
IFA 法抗体检测用 ALV 感染细胞的制备

在已铺满 CEF(C/E)单层细胞的细胞瓶或培养皿中接种 0.5 mL 含 10^3 $TCID_{50}$ 的 ALV(如 ALV-J)悬液，37 ℃ 5%二氧化碳恒温培养箱中培养，24 h 后换 1%小牛血清的 DMEM 培养基继续培养。继续培养 5 d 后将细胞单层用胰酶（见附录 A）溶液消化分散成悬液，经离心后，重新悬浮于 5%小牛血清的 DMEM 培养基中。将细胞浓度调至每毫升 5×10^5 个细胞。在加入盖玻片的培养皿中加入 5 mL 细胞悬液，或在 96 孔细胞培养板上每孔加入 100 μL 细胞悬液。在 37 ℃继续培养 4 d。将盖玻片从培养皿中取出或 96 孔细胞培养板弃去培养基，在磷酸盐缓冲液中漂洗一次后，滴加预冷的丙酮-乙醇(6∶4)固定液室温固定 5 min。自然干燥后，用塑料薄膜包裹后置－20 ℃保存。

附　录　G
（资料性附录）
J亚群禽白血病病毒荧光定量PCR检测方法的实验室规范

G.1　实验室设置要求

G.1.1　实验室分为三个相对独立的工作区域：样本制备区、PCR反应混合物配制区和检测区，并且明确标识。
G.1.2　每一区域需有专用的仪器设备，并且明确标识。
G.1.3　进入各个工作区域严格遵循单一方向顺序，即只能从样本制备区经PCR反应混合物配制区至检测区。
G.1.4　在不同的工作区域应使用不同颜色或有明显区别标志的工作服，工作服不能穿离各特定区域。
G.1.5　实验室清洁时应按PCR反应混合物配制区、样本制备区至检测区的顺序进行。
G.1.6　不同的实验区域应有其各自的清洁用具以防止交叉污染。

G.2　工作区域仪器设备配置

G.2.1　样本制备区仪器设备配置

2 ℃～8 ℃冰箱；－20 ℃冰箱；冰冻台式离心机（≥12 000 r/min）；混匀器；微量加样器（0.5 μL～10 μL，5 μL～20 μL，20 μL～200 μL，200 μL～1 000 μL）；可移动紫外灯。

G.2.2　PCR反应混合物配制区仪器设备配置

2 ℃～8 ℃冰箱；－20 ℃冰箱；台式离心机（≥3 000 r/min）；混匀器；微量加样器（0.5 μL～10 μL，5 μL～20 μL，20 μL～200 μL，200 μL～1 000 μL）；可移动紫外灯。

G.2.3　检测区仪器设备配置

荧光PCR仪；可移动紫外灯；打印机。

G.3　各工作区域功能及注意事项

G.3.1　样本制备区

G.3.1.1　标本的保存，核酸提取、贮存及其加入至扩增反应管在样本制备区进行。
G.3.1.2　可在本区内设立正压条件以避免邻近区的气溶胶进入本区造成污染。
G.3.1.3　用过的加样器吸头放入专门的消毒（例如含次氯酸钠溶液）容器内。实验室桌椅表面每次工作后都要清洁，实验材料（原始样本、提取过程中样本与试剂的混合液等）如出现外溅，作清洁处理并作出记录。
G.3.1.4　对实验台适当的紫外照射（254 nm波长，与工作台面近距离）可以帮助灭活病毒和消除核酸的污染。工作后通过移动紫外线灯管来确保对实验台面的充分照射。

G.3.2　PCR反应混合物配制区

G.3.2.1　试剂的分装和反应混合液的制备在本区进行。

G.3.2.2　在整个本区的实验操作过程中，操作者戴手套。工作结束后立即对工作区进行清洁。本工作区的实验台表面应可耐受诸如次氯酸钠等化学物质的消毒清洁作用。

G.3.3　检测区

G.3.3.1　在本区进行荧光 PCR 检测。

G.3.3.2　PCR 扩增产物不能在本实验室开盖，PCR 管抛弃在远离本实验室的垃圾箱中。

G.3.3.3　实验完成后采用紫外灯对实验室进行充分照射。

附 录 H
（资料性附录）
J亚群禽白血病病毒一步法荧光定量 RT-PCR检测试剂盒的组成及使用

H.1 试剂盒组成

每个试剂盒可做48个检测，包括以下成分：

RT-PCR反应液	750 μL×1管
*Taq*酶	12.5 μL×1管
逆转录酶	12.5 μL×1管
阴性对照	1.0 mL×1管
阳性对照	1.0 mL×1管
DEPC水	1 mL×1管
裂解液	30 mL×1管

H.2 说明

H.2.1 RT-PCR反应液(1×)：含50 mmol/L氯化钾，10 mmol/L Tris.Cl(pH8.3)，2.5 mmol/L氯化镁，0.2 mmol/L dNTP(deoxyribonucleoside triphosphate，脱氧核苷三磷酸)混合物，上、下游引物各20 nmol/mL，探针10 nmol/mL，2 mmol/L二硫苏糖醇(DTT)，5%甘油。

H.2.2 阳性对照：ALV-J靶基因RNA经稀释保存于75%的乙醇中。

H.2.3 裂解液为Trizol，于4 ℃保存，也可采用功能等效的提取试剂。

H.3 使用时的注意事项

H.3.1 在检测过程中，严防不同样品间的交叉污染。

H.3.2 反应液分装时应避免产生气泡，上机前检查各反应管是否盖紧，以免荧光物质泄露污染仪器。