

# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T 3235—2018

---

## 羊传染性脓疱诊断技术

Diagnostic techniques for contagious ecthyma

2018-05-07 发布

2018-09-01 实施

---

中华人民共和国农业农村部 发布

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由农业农村部兽医局提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:吉林省畜牧兽医科学研究院、吉林省动物疫病预防控制中心。

本标准主要起草人:邵洪泽、付殿国、王楠、程荣华、柴方红、于钦磊、董航、呼延含蓉、郭衍冰、孙强、李昱洁、刘沂霖、石春军、陆秀娟。

## 引 言

羊传染性脓疱,又称羊接触传染性脓疱皮炎(俗称羊口疮),是由痘病毒科副痘病毒属的传染性脓疱病毒引起绵羊、山羊的一种急性接触传染性、嗜上皮性的人兽共患病。以在口、唇、舌、鼻、乳房等部位的皮肤和黏膜形成丘疹、水疱、脓疱、溃疡及结成疣状厚痂为特征。羔羊最为易感,常引起群体发病。我国将其列为三类动物疫病。

本病最早于 1920 年发现于欧洲,现已广泛分布于全世界。我国新疆、甘肃、青海、内蒙古以及东北三省等养羊地区均有本病发生和流行的报道。发病率 30%~50%,羔羊死亡率高,可达 20%。该病为人兽共患病,人主要通过皮肤擦伤而感染。

OIE《陆生动物诊断试验和疫苗手册(哺乳动物、禽鸟与蜜蜂)》中未见羊传染性脓疱相关诊断标准。本病确诊可采用病毒分离培养或对病料进行负染色直接进行电镜观察,还可用血清学方法诊断,如中和试验等。另外,聚合酶链式反应(PCR)和实时荧光定量 PCR 可快速检测本病的病原。

# 羊传染性脓疱诊断技术

## 1 范围

本标准规定了羊传染性脓疱的临床诊断、样品的采集和处理、病毒分离培养、动物接种试验、电镜形态学观察、聚合酶链式反应(PCR)、实时荧光定量 PCR 和综合判定方法。

本标准适用于羊传染性脓疱的诊断。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

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

GB/T 27401 实验室质量控制规范 动物检疫

## 3 生物安全措施

所有培养物和废弃物的处置应按照 GB 19489 的有关规定执行。

## 4 防污染措施

防止污染措施应符合 GB/T 27401 的规定。

实验室应根据实验要求分为相对独立的工作区域,避免不同工作区域内的设备、物品混用;每一个区域应有专用的仪器设备。

## 5 临床诊断

### 5.1 流行病学

5.1.1 病羊和带毒羊是本病的主要传染源。

5.1.2 易感羊经黏膜或皮肤,通过接触污染的饲料、饮水、垫草和用具等而感染。哺乳母羊常因羔羊吮乳而发生乳头擦伤,导致易于感染病毒而发病,并将病毒传播给吮乳羔羊。

5.1.3 绵羊和山羊易感染,以 3 月龄~6 月龄发病最多。

### 5.2 临床症状

5.2.1 潜伏期 4 d~7 d。病羊常在口角、上唇或鼻镜上出现散在的小红斑点,并迅速变为丘疹,继而发展成水疱或脓疱。水疱或脓疱破裂后形成黄色或棕色的疣状硬痂(参见附录 A 中的 A.1)。

5.2.2 病羊良性经过时,硬痂增厚、干燥,并于 1 周~2 周内脱落而恢复正常。

5.2.3 严重病例的患部继续发生丘疹、水疱和脓疱,痂皮互相融合,波及整个口唇周围及颜面和眼睑。可形成大片具有龟裂并易出血的污秽痂垢,呈桑葚状或花椰菜状,痂下肉芽增生(参见 A.2)。严重影响羊采食,以致日渐消瘦,并可导致死亡。病程可长达 2 周~3 周。

5.2.4 口腔黏膜也常出现水疱、脓疱和烂斑,恶化时可形成大面积溃疡。

5.2.5 母羊乳头病变与口唇相似,但痂皮稍薄。

5.2.6 有时在蹄叉、蹄冠部皮肤上出现水疱、脓疱,破裂后形成污秽溃疡。

### 5.3 病理变化

口唇、蹄及外阴等处黏膜形成丘疹、水疱、脓疱、溃疡与疣状痂,组织上皮高度增生、变性、角化、坏死及表皮细胞浆中有嗜酸性包涵体形成。

## 6 样品的采集和处理

### 6.1 材料

#### 6.1.1 仪器

6.1.1.1 电子天平。

6.1.1.2 研磨器。

6.1.1.3 低温高速离心机。

6.1.1.4 冰箱。

6.1.1.5 可调微量移液器:200  $\mu\text{L}$ ~1 000  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ ~200  $\mu\text{L}$ 。

#### 6.1.2 耗材

6.1.2.1 吸头:1 000  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$ 。

6.1.2.2 Eppendorf 管:1.5 mL、0.5 mL、0.2 mL。

6.1.2.3 棉签。

#### 6.1.3 试剂

6.1.3.1 除有特殊说明外,所用试剂均为分析纯;试验用水符合 GB/T 6682 中一级水的要求。

6.1.3.2 0.01 mol/L PBS 液:含青霉素 2 000 IU/mL、链霉素 2 000 mg/mL,pH 7.0~7.2。

## 6.2 方法

### 6.2.1 痂皮

采集病羊的口、唇、乳房等部位的痂皮 1 g,置于放有干燥剂(硅胶或其他干燥剂)的灭菌烧杯中,置冰盒内送检。将痂皮剪碎、研磨,置于 4 mL 的 0.01 mol/L PBS 缓冲液(含青霉素 2 000 IU/mL、链霉素 2 000 mg/mL,pH 7.0~7.2),重悬。4℃浸渍 16 h~20 h,以 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液。-20℃保存备用。

### 6.2.2 水疱液

采集未破裂的丘疹水疱液,置于 2 倍体积的 0.01 mol/L PBS 缓冲液(含青霉素 2 000 IU/mL、链霉素 2 000 mg/mL,pH 7.0~7.2)的灭菌试管中,置冰盒内送检。样品 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液。-20℃保存备用。

## 7 病毒分离培养

### 7.1 材料

#### 7.1.1 仪器

7.1.1.1 低温高速离心机。

7.1.1.2 生物安全柜。

7.1.1.3 CO<sub>2</sub> 培养箱。

7.1.1.4 倒置显微镜。

7.1.1.5 冰箱。

7.1.1.6 可调微量移液器:200  $\mu\text{L}$ ~1 000  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ ~200  $\mu\text{L}$ 、2  $\mu\text{L}$ ~20  $\mu\text{L}$ 、0.5  $\mu\text{L}$ ~10  $\mu\text{L}$ 。

#### 7.1.2 耗材

7.1.2.1 吸头:1 000  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{L}$ 。

7.1.2.2 Eppendorf 管:1.5 mL、0.5 mL、0.2 mL。

7.1.2.3 75 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶。

### 7.1.3 试剂

7.1.3.1 除有特殊说明外,所用试剂均为分析纯;试验用水符合 GB/T 6682 中一级水的要求。

7.1.3.2 MEM 细胞培养液。

7.1.3.3 胎牛血清:56℃灭活 30 min。

7.1.3.4 细胞营养液:90% MEM,10%胎牛血清(含青霉素 100 IU/mL 和链霉素 100 mg/mL,0.03 g/mL 谷氨酰胺,用 75 g/L NaHCO<sub>3</sub> 溶液调 pH 至 7.0~7.2)。

7.1.3.5 细胞维持液:98% MEM,2%胎牛血清(含青霉素 100 IU/mL 和链霉素 100 mg/mL,0.03 g/mL 谷氨酰胺,用 75 g/L NaHCO<sub>3</sub> 溶液调 pH 至 7.0~7.2)。

### 7.1.4 细胞

犊牛睾丸原代细胞、犊牛肾原代细胞胎或羊皮肤细胞任一种,制备方法见附录 B 中的 B.1、B.2 和 B.3。

## 7.2 方法

7.2.1 按附录 B 制备任一种单层细胞,待细胞长成良好的单层后(参见 A.3)。

7.2.2 倒掉细胞营养液,接种 6.2 制备病毒液样品 1.0 mL,37℃吸附 1 h。

7.2.3 将病毒液倒出,加入细胞维持液 10 mL,置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养。

7.2.4 每天观察细胞变化,连续观察 5 d。如接毒后 1 d~5 d 内细胞出现变圆、肿胀,细胞间质增宽,折光性增强,细胞团聚、脱落等细胞病变效应(CPE),且病变达 70%~80%时收获病毒液(参见 A.4);将病变细胞培养液反复冻融 3 次,-20℃保存备用。如果盲传 3 代无细胞病变效应(CPE),则判为病毒分离阴性。

## 8 动物接种试验

### 8.1 试验程序

取 7.2 制备样品 0.2 mL,划痕接种临床健康 3 月龄~5 月龄羔羊唇黏膜。

### 8.2 结果判定

若接种后 3 d~4 d 出现划线红肿,5 d~7 d 出现水泡或脓疱等典型的临床症状,接种试验为阳性。若无临床症状,则判为阴性。

## 9 电镜形态学观察

### 9.1 材料

#### 9.1.1 仪器

9.1.1.1 低温高速离心机。

9.1.1.2 生物安全柜。

9.1.1.3 电镜。

9.1.1.4 可调微量移液器:20 μL~200 μL。

#### 9.1.2 耗材

9.1.2.1 普通平皿。

9.1.2.2 滤纸。

9.1.2.3 吸头:200 μL。

9.1.2.4 Eppendorf 管:1.5 mL。

9.1.2.5 支持网。

### 9.1.3 试剂

2%磷钨酸溶液:pH 6.8。

### 9.2 方法

取病变细胞培养液反复冻融 3 次后,3 000 r/min 离心 10 min,弃大部分上清液,留少量上清液重悬。吸少量沉淀悬液或者 6.2 制备样品,直接滴在支持网上,悬液在网上呈半球形。2 min~3 min 后,用一片干净滤纸从网边吸去液体。再滴磷钨酸染液在网上,染色 1 min。用滤纸吸去染液,立即进行电镜观察或置干燥器内短期保存。

### 9.3 结果判定

透射电镜观察,病毒大小约为 280 nm×140 nm,表面呈规则的网状结构。网状结构有规则地斜向平行地沿着病毒颗粒长轴呈“8”字缠绕的毛线团样。若发现毛线团样特殊表面结构的病毒粒子(参见 A.5)可判为电镜形态学观察为阳性,未观察到则判为阴性。

## 10 聚合酶链式反应(PCR)

### 10.1 材料

#### 10.1.1 仪器

10.1.1.1 PCR 仪。

10.1.1.2 低温高速离心机。

10.1.1.3 电泳槽。

10.1.1.4 电泳仪。

10.1.1.5 紫外线灯或紫外凝胶成像仪。

10.1.1.6 冰箱。

10.1.1.7 可调微量移液器:200  $\mu$ L~1 000  $\mu$ L、20  $\mu$ L~200  $\mu$ L、2  $\mu$ L~20  $\mu$ L、0.5  $\mu$ L~10  $\mu$ L。

#### 10.1.2 耗材

10.1.2.1 吸头:1 000  $\mu$ L、200  $\mu$ L、20  $\mu$ L、10  $\mu$ L。

10.1.2.2 Eppendorf 管:1.5 mL、0.5 mL、0.2 mL。

#### 10.1.3 试剂

10.1.3.1 除有特殊说明外,所有实验用试剂均为分析纯;实验用水符合 GB/T 6682 中一级水的要求。

10.1.3.2 标准阳性样品为羊传染性脓疱病毒核酸。

10.1.3.3 阴性对照样品为灭菌双蒸水。

10.1.3.4 PCR 试剂盒(或 10×PCR 缓冲液、5 U/ $\mu$ L Taq DNA 聚合酶、25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、10 mmol/L dNTP、灭菌双蒸水)。

10.1.3.5 1%溴化乙锭(EB)溶液或代替物。

10.1.3.6 TAE 电泳缓冲液。

10.1.3.7 琼脂糖。

10.1.3.8 上样缓冲液。

10.1.3.9 DNA Marker。

10.1.3.10 病毒 DNA 提取试剂盒。

#### 10.1.4 引物序列

上游引物:5'-GACCCCGAGCTCATGGT-3';

下游引物:5'-GCCGCGTCTTCACCTGTA-3'。

使用时配制成 10  $\mu\text{mol/L}$  工作液,置-20℃保存。

## 10.2 模板的制备

取 6.2 或 7.2 制备样品,采用病毒 DNA 提取试剂盒提取核酸作为待检样品模板。

## 10.3 方法

### 10.3.1 反应体系

PCR 扩增反应采用 25  $\mu\text{L}$  反应体系,依次加入下列试剂:

|                                  |                      |
|----------------------------------|----------------------|
| 10×PCR 缓冲液                       | 2.5 $\mu\text{L}$ ;  |
| dNTP(10 mmol/L)                  | 0.5 $\mu\text{L}$ ;  |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/L)    | 2.0 $\mu\text{L}$ ;  |
| Taq DNA 聚合酶(5 U/ $\mu\text{L}$ ) | 0.5 $\mu\text{L}$ ;  |
| 上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$ )      | 1.0 $\mu\text{L}$ ;  |
| 下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$ )      | 1.0 $\mu\text{L}$ ;  |
| 样品模板                             | 2.0 $\mu\text{L}$ ;  |
| 补充灭菌双蒸水(ddH <sub>2</sub> O)至     | 25.0 $\mu\text{L}$ 。 |

### 10.3.2 反应程序

95℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,62℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,35 个循环;72℃延伸 10 min。

## 10.4 电泳

10.4.1 用 100 mL TAE 溶液加热溶解 1.5 g 琼脂糖,50℃时加 1%溴化乙锭(EB)溶液或代替物 1  $\mu\text{L}$ ,制备琼脂糖凝胶板。

10.4.2 取阳性样品、阴性样品及待检样品 PCR 产物各 8  $\mu\text{L}$ ,分别与上样缓冲液 2  $\mu\text{L}$  混合,加入琼脂糖凝胶板的加样孔中。另有 1 孔直接加入 DNA Marker。

10.4.3 以 5 V/cm 电压电泳 30 min。

10.4.4 在紫外线灯下观察或者用紫外凝胶成像仪拍照。

## 10.5 结果

### 10.5.1 成立条件

阳性样品出现大小约 235 bp 扩增带(参见 A.6、A.7),阴性样品未出现,判为试验成立。

### 10.5.2 结果判定

如出现与阳性样品相同的大小约 235 bp 扩增条带,判为样品为阳性,如未出现则判为阴性。

## 11 实时荧光定量 PCR

### 11.1 材料

#### 11.1.1 仪器

11.1.1.1 荧光 PCR 仪。

11.1.1.2 低温高速离心机。

11.1.1.3 冰箱。

11.1.1.4 可调微量移液器:200  $\mu\text{L}$ ~1 000  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ ~200  $\mu\text{L}$ 、2  $\mu\text{L}$ ~20  $\mu\text{L}$ 、0.5  $\mu\text{L}$ ~10  $\mu\text{L}$ 。

#### 11.1.2 耗材

11.1.2.1 吸头:1 000  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{L}$ 。

11.1.2.2 8 联管。



11.1.2.3 Eppendorf 管:1.5 mL、0.5 mL、0.2 mL。

### 11.1.3 试剂

11.1.3.1 除有特殊说明外,所有实验用试剂均为分析纯;实验用水符合 GB/T 6682 中一级水的要求。

11.1.3.2 标准阳性样品为羊传染性脓疱病毒核酸。

11.1.3.3 阴性对照样品为灭菌双蒸水。

11.1.3.4 SYBR Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)。

11.1.3.5 ROX Reference Dye(50×)。

11.1.3.6 灭菌双蒸水。

11.1.3.7 病毒 DNA 提取试剂盒。

### 11.1.4 引物

上游引物 P1:5'-CAGTATGCTACTCACACAGTCG-3';

下游引物 P2:5'-GCATCACCTCTTCCAAGTAAAAC-3'。

使用时配制成 10 μmol/L 工作液,置-20℃保存。

### 11.2 模板的制备

同 10.2。

### 11.3 方法

#### 11.3.1 反应体系

采用 25 μL 反应体系,依次加入下列试剂:

|                        |          |
|------------------------|----------|
| SYBR Premix Ex Taq     | 12.5 μL; |
| P1(10 μmol/L)          | 0.5 μL;  |
| P2(10 μmol/L)          | 0.5 μL;  |
| ROX Reference Dye(50×) | 0.5 μL;  |
| DNA 模板                 | 2.0 μL;  |
| 用灭菌蒸馏水补至               | 25.0 μL。 |

#### 11.3.2 反应程序

95℃预变性 60 s;95℃变性 5 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,40 个循环。观察在 60℃退火温度下扩增曲线。

### 11.4 结果

#### 11.4.1 成立条件

进行实时荧光定量 PCR 检测,阳性对照能够扩增出 S 形曲线(参见 A.8、A.9),Ct 值在预期的范围之内(<35),阴性对照无荧光增幅现象,则表明反应体系运行正常,可以进行结果判定。

#### 11.4.2 结果判定

阴性反应结果判定:检测结果无 Ct 值的反应判为阴性反应,即检验样品中羊传染性脓疱病毒核酸阴性。

阳性反应结果判定:检测结果 Ct 值<35,且扩增曲线有明显的对数增长期,判为阳性反应,即检验样品中羊传染性脓疱病毒核酸阳性。

对于 35<Ct 值<40 的样品,应进行重复试验。如果重复试验的 Ct 值<40,且曲线有明显的对数增长期,判为阳性反应。

## 12 综合判定

### 12.1 可疑

符合流行病学、临床症状和病理变化特点,为羊传染性脓疱可疑病例。

## 12.2 确诊

符合流行病学和临床症状、病理变化的病例,电镜形态学观察、PCR、实时荧光定量 PCR 结果中有一项检测结果为阳性,可判定为羊传染性脓疱确诊病例。

样品病毒分离培养、动物接种试验检测结果为阳性且电镜形态学观察、PCR、实时荧光定量 PCR 检测中有一项为检测结果阳性,可判定为羊传染性脓疱病毒分离阳性。

附 录 A  
(资料性附录)  
相关图片及基因序列资料

A.1 口唇处出现大小不等的疣状增生



A.2 羊下唇内侧黏膜桑葚状肉芽增生



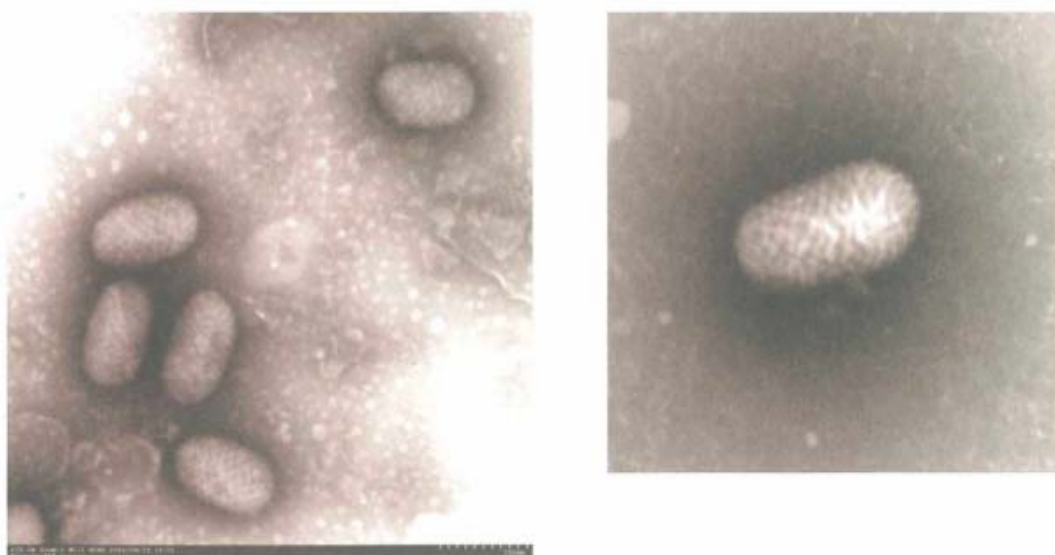
A.3 正常犊牛肾细胞图(×100)



A.4 病变犊牛肾细胞图(×100)



A.5 羊传染性脓疱病毒电镜负染图



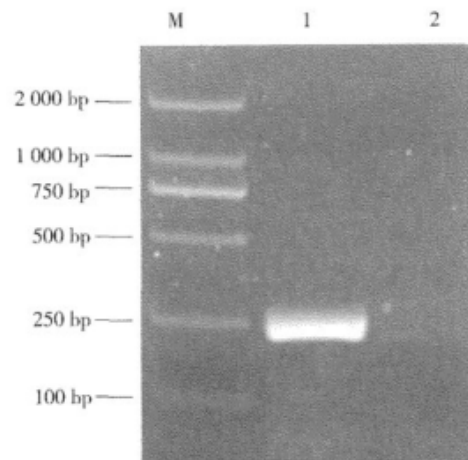
A.6 聚合酶链式反应(PCR)扩增目的基因序列

羊传染性脓疱病毒 F1 L 基因部分序列(GenBank:FJ808075.1)

```

550  g  accccgagct catggtctac cccggcgggt acgacgtctc gctagacgcc tacatcatca acgtcggcgg catgaagaag
ctctacgacg cgatcatcaa ggaggaggagg ctgcgcagcg gcctgctcac cgaggtgttc acgctggaga agcggctctc tctggcgcgc
gtggtgctct ccggcgccga gcaggtggtc taccceagat actacatata ggtgaagacg cggc 784
    
```

A.7 聚合酶链式反应(PCR)产物电泳图



说明:

M——DL 2 000 Marker;

1——阳性样品;

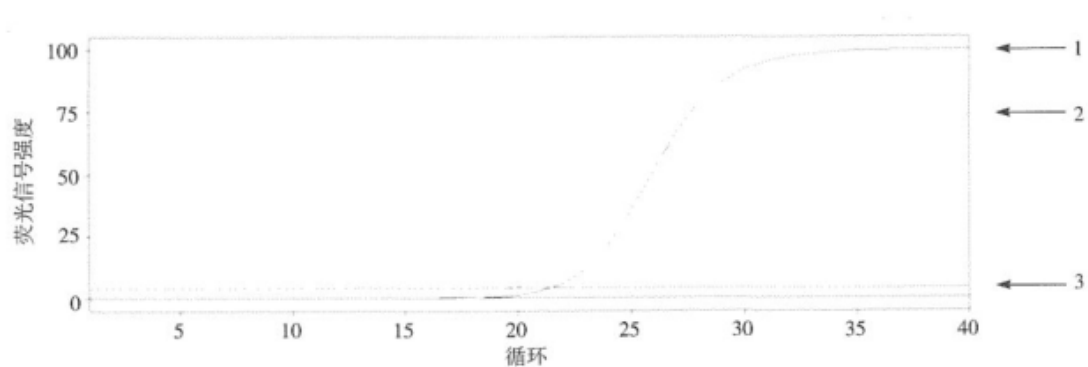
2——阴性样品。

#### A.8 实时荧光定量 PCR 扩增目的基因序列

羊传染性脓疱病毒 IL - 10 - like protein(ORFV127)gene 基因部分序列(GenBank:KP339943.1)

213 cagtatgc tactcacaca gtcgtctctc gacgacttca aaggctacct cgggtgtcag gcactctctg agatgataca gttttact-  
tg g 301

#### A.9 实时荧光定量 PCR 结果图



说明:

1——阳性对照;

2——阳性样品;

3——阴性对照。

**附 录 B**  
(规范性附录)  
**原代细胞制备与培养**

**B.1 犊牛睾丸细胞制备与培养**

**B.1.1** 无菌采取1日龄~3日龄健康犊牛睾丸,直接放入灭菌平皿中,用灭菌0.01 mol/L PBS缓冲液(含青霉素2 000 IU/mL、链霉素2 000 mg/mL,pH 7.0~7.2)冲洗至无血液。

**B.1.2** 取出睾丸放入平皿内,用眼科剪刀和镊子去掉白膜,将实质置于一灭菌烧杯中,加入灭菌0.01 mol/L PBS缓冲液(含青霉素2 000 IU/mL、链霉素2 000 mg/mL,pH 7.0~7.2)冲洗一次。

**B.1.3** 倒出PBS溶液,将实质剪碎,用灭菌0.01 mol/L PBS缓冲液(含青霉素2 000 IU/mL、链霉素2 000 mg/mL,pH 7.0~7.2)冲洗4次,加入实质4倍体积的0.25%的胰蛋白酶溶液冲2次,第三次加入胰蛋白酶溶液后放入37℃恒温水浴箱中消化20 min。

**B.1.4** 用吸管吸出胰蛋白酶溶液,加入MEM细胞培养液反复吹打,使细胞分散悬浮。

**B.1.5** 用灭菌4层纱布过滤,滤液以2 000 r/min离心10 min,去上清液,用细胞营养液悬浮细胞,分装于细胞瓶(细胞量 $4 \times 10^5$  个/mL~ $6 \times 10^5$  个/mL),于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。

**B.2 犊牛肾细胞制备与培养**

**B.2.1** 选择健康初生的犊牛。颈动脉放血致死,体表洗刷消毒后,仰卧自腹部以无菌手术取肾脏置于无菌平皿中。

**B.2.2** 用眼科剪刀和镊子去掉脂肪和肾外膜,加灭菌0.01 mol/L PBS缓冲液(含青霉素2 000 IU/mL、链霉素2 000 mg/mL,pH 7.0~7.2)冲洗一次。

**B.2.3** 取皮质部分置于一灭菌烧杯中,用眼科剪刀剪成 $0.5 \text{ mm}^3 \sim 1 \text{ mm}^3$ 的小块。加灭菌0.01 mol/L PBS缓冲液(含青霉素2 000 IU/mL、链霉素2 000 mg/mL,pH 7.0~7.2)冲洗至无血液。

**B.2.4** 转入细口瓶内,加入实质4倍体积的0.25%的胰蛋白酶溶液冲2次,第三次加入胰蛋白酶溶液后放入37℃恒温水浴箱中消化40 min,期间每隔5 min~10 min摇晃一次。

**B.2.5** 用吸管吸出胰蛋白酶溶液,加入MEM细胞培养液反复吹打,使细胞分散悬浮。

**B.2.6** 用灭菌4层纱布过滤,滤液以2 000 r/min离心10 min,去上清液,用细胞营养液悬浮细胞,分装于细胞培养瓶(细胞量 $4 \times 10^5$  个/mL~ $6 \times 10^5$  个/mL),于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。

**B.3 胎羊皮肤细胞的制备与培养**

**B.3.1** 无菌取出健康胎羊腹部或后肢内上侧皮肤小块,放入灭菌平皿中,用眼科剪刀剪成 $0.5 \text{ mm}^3 \sim 1 \text{ mm}^3$ 的小块。

**B.3.2** 用灭菌0.01 mol/L PBS缓冲液(含青霉素2 000 IU/mL、链霉素2 000 mg/mL,pH 7.0~7.2)的冲洗数次,直至无血液;用MEM冲洗3次,倒掉MEM后移入灭菌三角烧瓶内。

**B.3.3** 加入皮肤组织4倍体积的0.25%胰蛋白酶溶液冲洗2次,第三次加入胰蛋白酶溶液后放入37℃恒温水浴箱中消化30 min。

**B.3.4** 用吸管吸出胰蛋白酶溶液,加入MEM细胞培养液反复吹打,使细胞分散悬浮。

**B.3.5** 用4层纱布过滤,滤液2 000 r/min离心10 min,取细胞沉淀用细胞营养液悬浮,分装于细胞瓶(细胞量 $4\times 10^5$ 个/mL~ $6\times 10^5$ 个/mL),于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。

---