ICS 65.120
CCS S 851.2

团　　体　　标　　准

T/GDAAV 0211—2025

家禽细胞免疫应答评估方法的操作规范

Standard Operating Procedure for Assessing Cellular Immune Responses in Poultry

（征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX-XX-XX 发布　　XXXX-XX-XX 实施

广东省畜牧兽医学会　　发 布

目　　次

前　　言 III
引　　言 IV
1　范围 1
2　规范性引用文件 1
3　术语和定义 1
3.1　T 细胞 1
3.2　$CD4^+$ T 细胞 1
3.3　$CD8^+$ T 细胞 1
3.4　$CD4^+CD8^+$ T 细胞 1
3.5　免疫相关基因 1
4　缩略语 2
5　外周血单个核细胞及脾脏单个核细胞分离技术 3
5.1　仪器与设备 3
5.2　试剂与耗材 3
5.3　试验方法 3
5.4　结果判定 4
6　细胞表面标志物检测 4
6.1　仪器与设备 4
6.2　试剂与耗材 4
6.3　试验方法 5
6.4　结果判定 5
7　体外培养家禽 T 细胞技术 5
7.1　仪器和设备 5
7.2　试剂与耗材 6
7.3　试验方法 6
7.4　结果判定 7
8　IFN-γ ELISpot 检测法 7
8.1　仪器和设备 7
8.2　试剂与耗材 7
8.3　试验方法 7
8.4　结果判定 8
9　IFN-γ ICS 检测法 8
9.1　仪器和设备 8

9.2 试剂与耗材 8
9.3 试验方法 8
9.4 结果判定 9
10 实时荧光 RT-PCR 检测细胞因子转录水平 9
10.1 仪器与设备 9
10.2 试剂与耗材 9
10.3 试验方法 10
10.4 结果判定 10
11 ELISA 检测细胞因子蛋白水平 11
11.1 仪器与设备 11
11.2 试剂与耗材 11
11.3 试验方法 11
11.4 结果判定 12
12 综合判定 12
13 储存 12
13.1 储存操作 12
13.2 外周血单个核细胞及脾脏单个核细胞的保存方法 12
附录 A（资料性） 家禽细胞免疫应答评估方法的操作规范示意图 14
附录 B（资料性） 鸡中免疫相关基因的实时荧光 RT-PCR 引物序列 17

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。

本文件由华南农业大学、广东省畜牧兽医学会提出。

本文件由广东省畜牧兽医学会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

引　言

细胞免疫是宿主抵抗病毒、细菌等病原体感染的重要防御机制，主要依赖于 T 细胞和相关免疫分子发挥作用。与体液免疫产生抗体介导的快速响应不同，细胞免疫在病原清除及建立持久免疫记忆方面发挥关键作用。此外，细胞免疫还具有广泛的交叉保护作用，能够通过识别不同病毒株之间的保守抗原表位产生效应应答，抵抗异源病毒的感染。随着病原变异和免疫逃逸的复杂性增加，尤其是在控制禽流感等具有高度变异性的病毒时，增强宿主的细胞免疫反应已成为疫苗开发的重要目标之一。

目前，大多数传统的灭活疫苗主要诱导体液免疫反应，即通过抗体的产生来中和病毒。然而，单靠体液免疫不足以阻止病原的持续传播，尤其是在病原通过抗原漂移或抗原转换逃避宿主抗体监控的情况下。因此，未来的疫苗开发应当更加重视细胞免疫反应的诱导。为规范细胞免疫反应评估的标准，确保家禽细胞免疫评估在科研领域的规范化，并为相关科研人员提供明确的操作和评估标准，制定家禽细胞免疫应答评估方法的操作规范标准很有必要。

家禽细胞免疫应答评估方法的操作规范

1 范围

本文件规定了家禽的外周血单个核细胞及脾脏单个核细胞分离技术、细胞表面标志物检测、体外培养家禽T细胞技术、IFN-γ ELISpot检测法、IFN-γ ICS检测法、细胞因子转录水平实时荧光RT-PCR检测法以及细胞因子蛋白水平ELISA检测法。

本文件适用于病原微生物抗原刺激下家禽的细胞免疫应答评估研究。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过本文件的规范性引用而成为本文件必不可少的条款。其中，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 19489-2008 实验室生物安全通用要求

GB/T 24863-2010 畜禽细胞体外培养与冷冻保存技术规程

ISO 14698-1 生物污染控制规范性指南

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 T 细胞

一种来源于胸腺的淋巴细胞，在细胞免疫中发挥核心作用，分为$CD4^+$ T细胞、$CD8^+$ T细胞、$CD4^+CD8^+$ T细胞等亚群。

3.2 $CD4^+$ T 细胞

又称辅助性T细胞，表面带有CD3和CD4受体，通过释放多种细胞因子调节免疫反应。

3.3 $CD8^+$ T 细胞

又称细胞毒性T细胞，表面带有CD3和CD8受体，主要通过识别和杀伤病原体感染细胞，发挥免疫效应。

3.4 $CD4^+CD8^+$ T 细胞

双阳性T细胞，表面带有CD3、CD4和CD8受体，在家禽外周血中的含量较多，在脾脏和肠道中也有分布。

3.5 免疫相关基因

在宿主免疫反应中起关键作用的基因。如下所示：

细胞毒性相关基因：Granzyme A、Granzyme K、Perforin、IL-2、IFN-γ、TNF-α、NK lysin、PARP等。

抗病毒相关基因：IFN-α、IFN-β、MX1、OASL、MDA5，ISG12-2、IFIT5等。

Th2细胞因子：IL-4、IL-5、IL-10、IL-13等。

趋化因子：CXCLi1、CXCLi2等。

模式识别受体：TLR-3、TLR-7等。

炎性因子：IL-1β、IL-6等。

免疫调节因子：TGF-β3、IL-10等。

4 缩略语

AIV：禽流感病毒（Avian Influenza Virus）

APC：抗原递呈细胞（Antigen-presenting Cells）

CXCLi1：CXC基序趋化因子配体1（C-X-C Motif Chemokine Ligand 1）

CXCLi2：CXC基序趋化因子配体2（C-X-C Motif Chemokine Ligand 2）

FBS：胎牛血清（Fetal Bovine Serum）

Granzyme A：颗粒酶A（Granzyme A）

Granzyme K：颗粒酶K（Granzyme K）

IL-1β：白细胞介素-1β（Interleukin-1 Beta）

IL-2：白细胞介素-2（Interleukin-2）

IL-4：白细胞介素-4（Interleukin-4）

IL-5：白细胞介素-5（Interleukin-5）

IL-6：白细胞介素-6（Interleukin-6）

IL-10：白细胞介素-10（Interleukin-10）

IL-13：白细胞介素-13（Interleukin-13）

IFIT5：干扰素诱导蛋白5（Interferon-induce protein with tetratricopeptide repeats 5）

IFN-α：干扰素-α（Interferon-Alpha）

IFN-β：干扰素-β（Interferon-Beta）

IFN-γ：干扰素-γ（Interferon-Gamma）

ISG12-2：干扰素刺激基因12-2（Interferon-stimulated gene 12-2）

MX1：抗黏病毒蛋白1（Myxovirus Resistance Protein 1）

MDA5：黑色素瘤分化相关基因5（Melanoma differentiation-associated gene 5）

MOI：感染复数（Multiplicity of Infection）

NK lysin：自然杀伤细胞溶素基因（NK lysin）

OASL：2'-5'-寡聚腺苷酸合成酶样蛋白（2'-5'-Oligoadenylate Synthetase-Like Protein）

PARP：聚腺苷二磷酸核糖聚合酶（Poly (ADP-Ribose) Polymerase）

PBMCs：外周血单个核细胞（Peripheral Blood Mononuclear Cells）

Perforin：穿孔素（Perforin）

TCID50：半数组织培养感染剂量（50% Tissue Culture Infective Dose）

TNF-α：肿瘤坏死因子-α（Tumor Necrosis Factor-Alpha）

TGF-β3：转化生长因子-β3（Transforming Growth Factor-Beta 3）

TLR-3：Toll样受体3（Toll-like Receptor 3）

TLR-7：Toll样受体7（Toll-like Receptor 7）

5 外周血单个核细胞及脾脏单个核细胞分离技术

5.1 仪器与设备

5.1.1 台式离心机。
5.1.2 无菌操作台。

5.2 试剂与耗材

5.2.1 鸡外周血单个核细胞分离试剂盒/鸡脏器组织单个核细胞分离试剂盒。
5.2.2 RP-10（含 10%胎牛血清 FBS 的 RPMI 1640 培养基）。
5.2.3 无菌 PBS（pH 7.4）。
5.2.4 血液抗凝管。
5.2.5 巴氏吸管或移液器吸头。
5.2.6 无菌离心管。

5.3 试验方法

5.3.1 外周血单个核细胞（PBMCs）的制备

5.3.1.1 样品稀释

将外周血样品（2 mL）以1:1体积用稀释液稀释，充分混匀。

5.3.1.2 密度梯度离心

将稀释后的血液缓慢加入等体积淋巴细胞分离液的上层，注意避免混合。以400 g/min 离心15 min，升速7，降速2，注意避免打破分层。

5.3.1.3 细胞收集与洗涤

小心吸取中间白色的淋巴细胞层至新的离心管中，加入PBS洗涤2次（440 g/min 离心5 min，每次更换PBS后重悬）。若出现红细胞污染，可利用0.5 mL红细胞裂解液重悬细胞3 min，然后加入PBS洗涤进行去除。

5.3.1.4 细胞重悬

用1 mL RP10培养基重悬细胞，计数后调整至1×10^6个/mL，放置于冰上待用。

5.3.2 脾脏单个核细胞的制备

5.3.2.1 脾脏收集

通过人道方法安乐死鸡只，取脾脏，用无菌PBS冲洗表面后去除多余筋膜。

5.3.2.2 组织处理

将脾脏剪成小块，加入5 mL RP10培养基。使用巴氏吸管轻轻吹打组织，制备成细胞悬液。通过40 μm无菌细胞滤网过滤，收集过滤后的细胞悬液。

5.3.2.3 密度梯度离心

将细胞悬液缓慢加入等体积鸡脏器组织单个核淋巴细胞分离液的上层，注意避免混合。以400 g/min离心15 min，升速7，降速2，形成分层。

5.3.2.4 细胞收集与洗涤

吸取中间白色细胞层至新离心管中。加入PBS洗涤2次（440 g/min离心5 min），然后弃去上清液。若出现红细胞污染，可利用0.5 mL红细胞裂解液重悬细胞3 min，然后加入PBS额外洗涤一步进行去除。

5.3.2.5 细胞重悬

用10 mL RP10培养基重悬细胞，计数后调整浓度为1×10^6个/mL，放置于冰上待用。

5.3.2.6 分层效果评估

检查淋巴细胞层的颜色和分布，确保分层清晰且污染少。若出现红细胞污染，可利用0.5 mL红细胞裂解液重悬细胞，然后通过PBS洗涤进行去除。

5.4 结果判定

5.4.1 细胞计数与存活率测定

5.4.1.1 计数方法

使用0.08%台盼蓝染液检测细胞存活率。取10 μL细胞悬液与40 μL PBS进行5倍稀释，再取10 μL稀释后的细胞悬液与10 μL染液1:1混合，共10倍稀释，再在血细胞计数板上进行计数。记录存活细胞和死亡细胞数量，存活率计算公式如下：

$$存活率（\%）=(\frac{存活细胞数}{总细胞数})\times100\%$$

5.4.1.2 细胞分离质量判定

存活率需保持在90%以上，且每个样品的细胞数量应不少于1×10^6个，以确保实验结果的可靠性和可重复性。

6 细胞表面标志物检测

6.1 仪器与设备

6.1.1 流式细胞仪。
6.1.2 低速离心机。
6.1.3 医用冰箱。
6.1.4 倒置显微镜。

6.2 试剂与耗材

6.2.1 Mouse Anti-Chicken CD3-APC 标记抗体。
6.2.2 Mouse Anti-Chicken CD4-FITC 标记抗体。
6.2.3 Mouse Anti-Chicken CD8α-PE 标记抗体。

6.2.4 流式 Buffer（无菌 PBS+1%FBS）。
6.2.5 台盼蓝染液。
6.2.6 离心管。
6.2.7 流式细胞仪专用检测管。

6.3 试验方法

6.3.1 细胞制备

从家禽外周血（每组应不少于6只鸡/鸭的个体重复）或脾脏（每组应不少于3只鸡/鸭的个体重复）分离PBMCs或脾脏单个核细胞，并使用淋巴细胞分离液获取淋巴细胞（详细步骤参照章节5）。用流式Buffer洗涤2次后调整细胞浓度至不少于1×10^6个细胞/mL，流式细胞仪收集细胞的数量应不少于3×10^5，以保证信号的可靠性。

6.3.2 抗体孵育

每管加入1×10^6个PBMCs或脾脏单个核细胞于流式细胞仪专用检测管中，使用下列抗体孵育：APC标记抗鸡CD3抗体、FITC标记抗鸡CD4抗体和PE标记抗鸡CD8α抗体。在避光条件下于4℃孵育30 min，孵育过程中每10 min轻轻混匀避免细胞沉淀。

6.3.3 洗涤

用流式Buffer洗涤3次：每次加入流式Buffer至1 mL，轻轻混匀后以440 g/min离心5 min。弃上清后重新悬浮细胞。

6.3.4 流式检测

将洗涤后的细胞重悬于500 μL流式Buffer。使用流式细胞仪进行分析。

6.3.5 数据分析

使用FlowJo V10软件对检测数据进行处理，设定$CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$及$CD4^+CD8^+$双阳性细胞的分析门限。根据软件生成的散点图和直方图确定T细胞亚群的比例。

6.4 结果判定

6.4.1 数据处理：数据以百分比表示，统计样本中 $CD3^+CD8^+$T 细胞、$CD3^+CD4^+$T 细胞及 $CD3^+CD4^+CD8^+$细胞的比例，如附录 A 图 1 和图 2 示例图所示。
6.4.2 实验对照：设置未标记样本（阴性对照）和单一荧光标记样本（用于补偿计算）。
6.4.3 实验效果评估：与无抗原刺激组（对照组）相比，抗原刺激组（或处理组）$CD3^+CD8^+$T 细胞、$CD3^+CD4^+$T 细胞及 $CD3^+CD4^+CD8^+$细胞的比例有显著差异（$P<0.05$ 或 0.01 或 0.001），若 T 细胞比例显著上调，说明可能刺激了 T 细胞效应应答，可进行效应应答检测。

7 体外培养家禽 T 细胞技术

7.1 仪器和设备

7.1.1 细胞培养箱。
7.1.2 低速离心机。
7.1.3 移液器。

7.1.4 细胞计数板。
7.1.5 流式细胞仪。
7.1.6 倒置显微镜。

7.2 试剂与耗材

7.2.1 Mouse Anti-Chicken CD3-APC 标记抗体。
7.2.2 Mouse Anti-Chicken CD4-FITC 标记抗体。
7.2.3 Mouse Anti-Chicken CD8α-PE 标记抗体。
7.2.4 刀豆凝集素（Concanavalin A，ConA）。
7.2.5 羧基荧光素琥珀酰亚胺酯（carboxyfluorescein succinimidyl ester，CFSE）。
7.2.6 T 细胞培养基（RMPI 1640 培养基中加入 10%胎牛血清，1%非必需氨基酸、1%谷氨酰胺、1%丙酮酸钠、1%双抗和 1‰β-巯基乙醇）。
7.2.7 流式 Buffer（99%PBS+1%FBS）。
7.2.8 RP-10（含 10%胎牛血清 FBS 的 RPMI 1640 培养基）。

7.3 试验方法

7.3.1 外周血或脾脏单核个细胞的制备

详细步骤参照章节5。

7.3.2 体外培养病毒特异性 T 细胞

7.3.2.1 抗原递呈细胞（APC）制备

取6×10^5细胞/孔于15 mL生化管中，病毒常规感染细胞后，继续孵育5 h，收集培养的感染细胞作为APC备用。

7.3.2.2 T 细胞培养及刺激

7.3.2.2.1 将从病原感染或免疫的家禽中分离记忆性 PBMCs 或脾脏单个核细胞调整至 3×10^6 细胞/mL，并接种到 48 孔板中，每孔 1 mL。
7.3.2.2.2 按以下分组设计实验，每组三个重复：
病毒刺激组：以5:1的比例加入感染的APC（即5个T细胞：1个APC）。
阳性对照组：每孔加入2.5 μg/mL的ConA。
阴性对照组：不添加刺激物。
7.3.2.2.3 将培养板置于 39℃、5% CO_2培养箱中培养。

7.3.2.3 细胞形态与数量观察

7.3.2.3.1 每天使用倒置显微镜观察细胞的形态变化。
7.3.2.3.2 每日取细胞悬液，用 0.08%台盼蓝染色后计数活细胞和总细胞数，记录细胞增殖情况。

7.3.3 CFSE 标记检测

实验前先将PBS与RP10培养基进行37℃预热。用PBS清洗细胞，440 g/min离心5 min，取一个15 mL离心管用5 mL预热的PBS重悬1×10^7个细胞，另取一个15 mL离心管用5 mL PBS稀释CFSE，将两管混合均匀，使CFSE终浓度为0.5 μM，于37℃避光孵育15 min。孵育完成后加入2 mL RP10终止染色，于440 g/min离心5 min，再弃掉上清并使用5 mL RP-10清洗2次，弃掉上清用T细胞培养基重悬。将CFSE标记后

的外周血单个核细胞或脾脏单个核细胞按照上述方法进行病毒特异性T细胞的体外培养，每天观察细胞的形态学变化，并通过流式细胞术检测分析T细胞比例变化，以记录细胞增殖变化情况。

7.3.3.1 流式细胞仪检测 T 细胞比例和绝对数量

每两天取细胞进行染色（详细步骤参照章节5），记录刺激组与未刺激组$CD3^+CD4^+$ T细胞，$CD3^+CD8^+$ T细胞和$CD3^+CD4^+CD8^+$ T细胞比例和绝对数量的变化。

7.4 结果判定

7.4.1 形态学变化：利用显微镜观察刺激后细胞的形态学变化，病毒刺激组和 ConA 刺激组的细胞会出现明显的聚团，未刺激组的细胞死亡数增多，出现一些贴壁细胞，如附录 A 图 3 所示。

7.4.2 CFSE 标记检测：病毒刺激组和 ConA 刺激组的细胞会出现多个增殖峰，而未刺激组没有增殖峰的出现，如附录图 4 示例图所示。

7.4.3 流式细胞术检测 T 细胞比例及绝对数量的变化：与未刺激的细胞相比，病毒刺激组和 ConA 刺激组的 T 细胞比例和绝对数量会显著增加，如附录 A 图 3 所示（$P<0.05$ 或 0.01 或 0.001）。

8 IFN-γ ELISpot 检测法

8.1 仪器和设备

8.1.1 细胞培养箱。

8.1.2 离心机。

8.1.3 移液器。

8.1.4 细胞计数板。

8.1.5 酶联免疫斑点分析仪。

8.2 试剂与耗材

8.2.1 鸡 IFN-γ ELISpot BASIC 试剂盒。

8.2.2 ELISpot 96 孔板。

8.2.3 小鼠抗鸡 IFN-γ 单克隆抗体。

8.2.4 生物素标记小鼠抗鸡 IFN-γ 单克隆抗体。

8.2.5 辣根过氧化物酶（HRP）标记的链霉亲和素。

8.2.6 RP-10（含 10%胎牛血清 FBS 的 RPMI 1640 培养基）。

8.2.7 PBS（pH 7.4）。

8.2.8 Wash Buffer（含 0.05% FBS 的 PBS）

8.2.9 TMB 显色溶液。

8.3 试验方法

8.3.1 孔板涂覆：将 ELISpot 96 孔板用 15 μg/mL 的小鼠抗鸡 IFN-γ 单克隆抗体（PBS 配制，pH 7.4）涂覆，每孔 100 μL。4℃孵育过夜后，用 PBS 洗涤孔板 5 次，每次 200 μL，去除多余抗体。

8.3.2 孔板封闭：用 RP-10 在室温下封闭孔板 2 h，每孔加入 200 μL。封闭后弃液，不需清洗。

8.3.3 细胞接种与刺激：收集鸡脾脏单个核细胞，分离并计数后调整浓度至 1×10^6 个细胞/100 μL。每孔加入脾脏单个核细胞 100 μL，并加入刺激物，包括阴性对照：RP-10；阳性对照：

PMA+Ionomycin（10 μg/mL）。实验组：病毒或抗原肽段（10 μg/mL）。然后在 37℃、5% CO_2条件下孵育 24 h。

8.3.4　检测抗体孵育：孵育结束后，弃上清液，用 Wash Buffer 洗涤孔板 5 次。每孔加入 1 μg/mL 的生物素标记小鼠抗鸡 IFN-γ 单克隆抗体 100 μL，室温孵育 2 h。孵育后洗涤 3 次，每孔加入 HRP 标记的链霉亲和素抗体 100 μL，室温孵育 1 h。

8.3.5　显色与终止：洗涤孔板 3 次后，每孔加入 100 μL TMB 显色溶液，显色时间控制在 10-15 min，避免过度显色导致背景增加。反应完成后，用超纯水洗涤 3 次终止反应，晾干孔板。

8.3.5.1　斑点计数：使用酶联免疫斑点分析仪计数斑点数量，记录各孔数据。

8.4　结果判定

8.4.1　斑点计数：使用酶联免疫斑点计数仪检测每孔斑点数量。数据以每 10^6 个细胞的斑点数表示。

8.4.2　阳性判定：与阴性对照相比，病毒或肽段刺激在至少 3 个生物学重复样本（至少 3 只鸡）中的 2 个生物学样本中诱导了显著的 IFN-γ 产生，则说明抗原可以刺激细胞毒性 T 细胞应答，如附录 A 图 5 示例图所示。

9　IFN-γ ICS 检测法

9.1　仪器和设备

9.1.1　细胞培养箱。
9.1.2　离心机。
9.1.3　移液器。
9.1.4　流式细胞仪。

9.2　试剂与耗材

9.2.1　Mouse Anti-Chicken CD8α-APC 标记抗体。
9.2.2　Rabbit Anti-Chicken IFN-γ 标记抗体。
9.2.3　Mouse Anti-Chicken TCRγδ-PE 标记抗体。
9.2.4　Goat Anti-Rabbit IgG-FITC 标记抗体。
9.2.5　流式 Buffer（无菌 PBS+1%FBS）。
9.2.6　离心管。
9.2.7　流式细胞仪专用检测管。
9.2.8　BFA（Brefeldin A）。
9.2.9　固定破膜剂。

9.3　试验方法

9.3.1　细胞培养

从家禽外周血或脾脏分离PBMCs或脾脏单个核细胞（详细步骤参照章节5），按照章节7中的方法进行T细胞体外培养。

9.3.2　抗原再刺激及封闭

按照章节7中的方法进行APC的孵育，按用每孔100 μL T细胞培养基重悬APC后加入到培养的细胞中，同时按照1：1000的比例加入BFA共孵育6 h。

9.3.3 表面标志物染色

取细胞用流式Buffer洗涤3次：每次加入PBS至1 mL，轻轻混匀后以400 g/min离心5 min。弃上清后用T细胞表面标记抗体（如TCRγδ, CD8α）稀释液重悬细胞（详细步骤参照章节6）。

9.3.4 固定破膜

用流式Buffer清洗细胞3次后，按照1×10^6个细胞/100 μL细胞固定破膜剂重悬细胞，4℃避光孵育20 min后，用清洗液（流式Buffer+破膜剂）清洗细胞3次。

9.3.5 胞内标志物染色

清洗离心后的细胞用抗体稀释液重悬，使用下列抗体孵育：兔抗鸡IFN-γ一抗。在避光条件下于4℃孵育30 min，轻轻混匀避免细胞沉淀。离心后用山羊抗兔IgG-FITC二抗进行标记染色。

9.3.6 数据分析

使用FlowJo V10软件对检测数据进行处理，设定APC，PE及FITC的分析门限。根据软件生成的散点图和直方图确定T细胞亚群的比例。

9.4 结果判定

9.4.1 数据处理：每组重复至少 3 次，取平均值。数据以百分比表示，统计样本中产生 IFN-γ 的 T 细胞比例。

9.4.2 实验对照：设置未标记样本（阴性对照）和单通道抗体染色标记样本（用于补偿计算）。

9.4.3 结果分析：按照上述方法进行检测，阳性样本会出现明显的分群，与未刺激组相比，刺激组中产生 IFN-γ 的 T 细胞百分比显著上调（$P<0.05$ 或 0.01 或 0.001），说明抗原刺激了特定 T 细胞亚类（如 γδCD8T 细胞）的细胞毒性 T 细胞应答如附录 A 图 6 示例所示。

10 实时荧光 RT-PCR 检测细胞因子转录水平

10.1 仪器与设备

10.1.1 实时荧光定量 PCR 仪。
10.1.2 高速冷冻离心机。
10.1.3 微量分光光度计。
10.1.4 微量离心机。
10.1.5 微量移液器。
10.1.6 PCR 仪。
10.1.7 流式细胞分选仪。

10.2 试剂与耗材

10.2.1 RNA 提取试剂盒。
10.2.2 RNA 反转录试剂盒。
10.2.3 DNasF I。

10.2.4 通用 SYBR qPCR MastFr 酶。
10.2.5 qRT-PCR 引物。
10.2.6 0.2 mL 半裙边 96 孔 qPCR 板。

10.3 试验方法

10.3.1 PBMCs 分离

详细步骤参照章节5的方法进行分离培养。

10.3.2 流式细胞术分选目的细胞群体

参照章节6的方法进行目的细胞群体的染色，用流式Buffer重悬细胞，使其密度为2×10^7/mL，然后通过流式分选仪进行细胞分选，具体流程图见附录A图7。

10.3.3 RNA 提取

10.3.3.1 根据 RNA 提取试剂盒产品说明书进行，使用微量分光光度计进行核酸含量测定。
10.3.3.2 RNA 纯度检测：用 NanoDrop 测量 A260/A280 比值（1.8-2.1）。
10.3.3.3 提取的 RNA 经 DNasF I 处理以去除基因组 DNA 污染。

10.3.4 cDNA 合成

根据RNA逆转录试剂盒产品说明书进行，使用 PCR 扩增仪获得cDNA。

10.3.5 qRT-PCR

10.3.5.1 根据 SYBR qPCR MastFr 酶使用说明书进行样本体系和程序的制定。
10.3.5.2 根据 qRT-PCR 仪的使用手册进行上机检测。

10.4 结果判定

10.4.1 数据处理

实时荧光定量PCR仪自动记录Ct值，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算相对表达量：

$$\Delta Ct = Ct_{\text{目标基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{实验组}} - \mathrm{Ct}_{\text{对照组}}$$

$$\text{相对表达量} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

10.4.2 数据展示

使用GraphPad Prism绘制基因表达差异柱状图，显示不同实验组间的表达量变化。

10.4.3 统计分析

数据用平均值（±）标准误表示，使用单因素方差分析（ANOVA）（用于比较3个或3个以上处理组之间的差异）或t检验进行组间（用于比较两个处理组之间的差异）。

10.4.4 判定标准

10.4.4.1　与对照组相比，刺激组中细胞毒性相关基因（如 IFN-γ，Granzyme A/K，Perforin，NK lysin，IL-2，TNF-α 和 PARP）和抗病毒基因（如 IFIT5，MX1，IFN-α/β，MDA5 和 OASL）的显著上调（P＜0.05 或 0.01 或 0.001），表明刺激了细胞毒性 T 细胞免疫应答反应；若是 Th2 细胞因子上调（如 IL-4，IL10 和 IL-13），说明刺激了辅助 T 细胞应答反应。

10.4.4.2　熔解曲线：检查特异性扩增单峰，无非特异性扩增。

11　ELISA 检测细胞因子蛋白水平

11.1　仪器与设备

11.1.1　Multiskan FC 酶标仪。
11.1.2　高速冷冻离心机。
11.1.3　微量离心机。
11.1.4　微量移液器。

11.2　试剂与耗材

11.2.1　IL-2 检测试剂盒。
11.2.2　IL-4 检测试剂盒。
11.2.3　IL-10 检测试剂盒。
11.2.4　TNF-α 检测试剂盒。

11.3　试验方法

11.3.1　抗原特异性家禽 T 细胞体外扩增培养

按照章节7的方法分离并培养家禽T细胞，通过抗原刺激特异性T细胞扩增，获得用于检测的培养样品。

11.3.2　样本处理

在培养第4天，使用无菌管收集细胞培养上清，400 g/min离心20 min，取上清用于检测。将细胞悬液用PBS稀释至约1×10^7/mL，反复冻融以破碎细胞，释放细胞内成分后再次离心20 min，收集上清备用。

11.3.3　标准曲线建立

11.3.3.1　在酶标板上设置 10 个标准品孔。

11.3.3.2　在第 1 和第 2 孔分别加入 100 μL 标准品溶液，然后分别加入 50 μL 标准品稀释液，混匀。

11.3.3.3　从第 1 和第 2 孔各取 100 μL 溶液转移到第 3 和第 4 孔，再分别加入 50 μL 标准品稀释液，混匀。

11.3.3.4　按上述方法依次稀释至第 9 和第 10 孔，混匀后弃去多余溶液，确保每孔体积均为 50 μL。稀释后的浓度分别为 90 ng/L、60 ng/L、30 ng/L、15 ng/L 和 7.5 ng/L。

11.3.4　样品检测

11.3.4.1　试剂准备：使用前充分混匀试剂，避免产生气泡，确保样品添加无误差。

11.3.4.2　加样操作：根据样品数量确定板条数，每个标准品及样品做 3 个重复。将样品用稀释液 1:1 稀释后，取 50 μL 加入反应孔中。

11.3.4.3　添加抗体：分别加入 50 μL 稀释后的标准品、样品及 50 μL 生物素标记抗体，轻轻混匀后 37℃温育 1 h。

11.3.4.4　洗涤：弃去孔内液体，每孔加入洗涤液至满，用吸水纸拍干，重复洗涤 3 次。如使用洗板机，洗涤次数增加至 4 次。

11.3.4.5　酶结合反应：每孔加入 80 μL 链酶亲和素-HRP 溶液，轻轻混匀后 37℃温育 30 min。

11.3.4.6　洗涤：弃去孔内液体，每孔加入洗涤液至满，用吸水纸拍干，重复洗涤 3 次。如使用洗板机，洗涤次数增加至 4 次。

11.3.4.7　显色反应：加入 50 μL 底物 A 和 B，混匀后避光温育 10 min。

11.3.4.8　终止反应：加入 50 μL 终止液，立即在 450 nm 波长下测定各孔的 OD 值。

11.4　结果判定

11.4.1　数据处理

使用Multiskan FC酶标仪记录OD值。以OD值为纵坐标（Y），标准品浓度为横坐标（X），通过ELISA Calc软件生成标准曲线并计算回归方程，利用回归方程推算样品表达浓度。

11.4.2　数据展示

采用GraphPad Prism软件绘制柱状图，展示不同实验组间的基因或蛋白表达水平差异，直观反映实验结果。

11.4.3　统计分析

数据以“平均值±标准误”表示，使用单因素方差分析（ANOVA）（用于比较3个或3个以上处理组之间的差异）或t检验进行组间（用于比较两个处理组之间的差异）。

11.4.4　判定标准

通过样品的基因或蛋白表达水平判断免疫反应状态。与未刺激组相比，刺激组中若是Th1细胞因子（如TNF-α和IL-2）显著上调（$P<0.05$或0.01或0.001），说明刺激了细胞毒性T细胞应答反应；若是与Th2细胞因子（如IL-4和IL-10）显著上调，说明刺激了辅助T细胞应答反应。如附录A图8示例图所示，蛋白分泌的变化表明免疫应答的强度和方向。

12　综合判定

流式检测T细胞比例上调，及通过IFN-γ ELISpot, IFN-γ ICS, ELISA、实时荧光RT-PCR中的任何一种或多种实验技术监测家禽T细胞产生效应因子，均可说明家禽T细胞在抗原刺激后产生效应应答。若要监测特定T细胞亚类产生效应应答，则只能通过IFN-γ ICS方法检测，或流式分选特定T细胞亚类后检测其效应应答。

13　储存

13.1　储存操作

储存的操作方法应符合 GB/T 24863-2010 要求。

13.2　外周血单个核细胞及脾脏单个核细胞的保存方法

建议 24 h 内可短期存储在 4℃，长期应储存在液氮中，避免细胞活性下降。

附 录 A
（资料性）
家禽细胞免疫应答评估方法的操作规范示意图

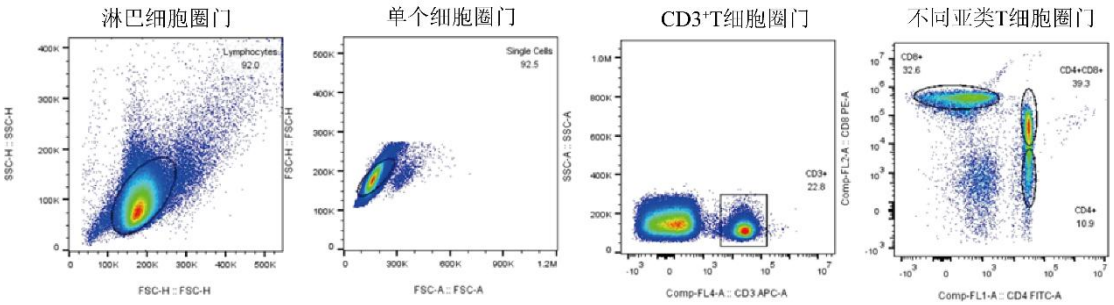

图 1 鸡 T 细胞圈门策略示例图

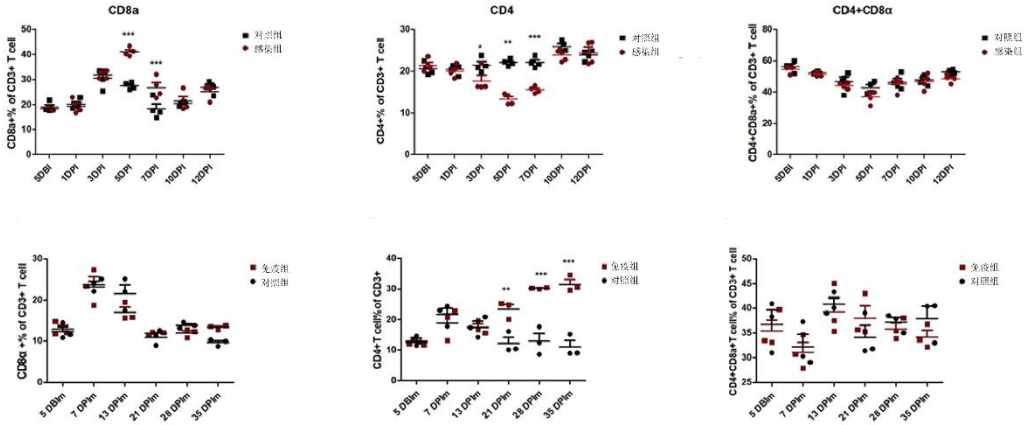

图 2 流式细胞法检测禽流感免疫或感染后鸡 T 细胞亚群比例示例图

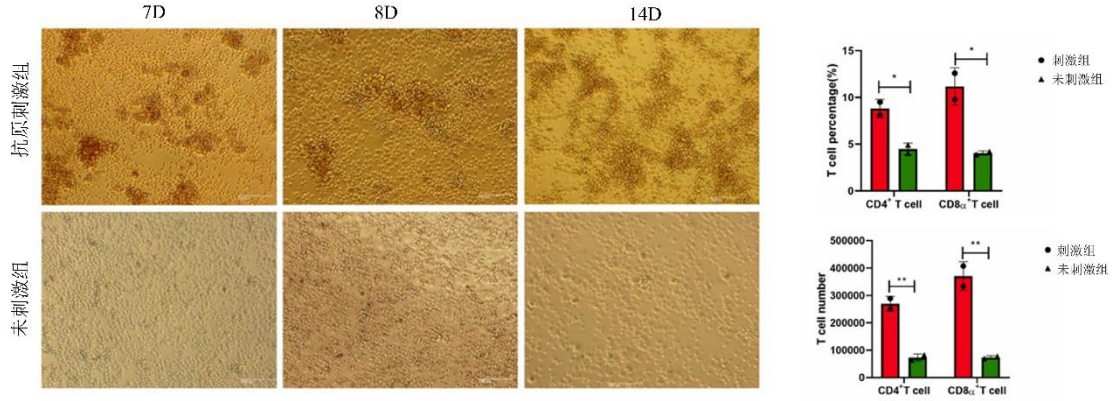

图 3 体外培养家禽 T 细胞形态变化及比例变化示例图

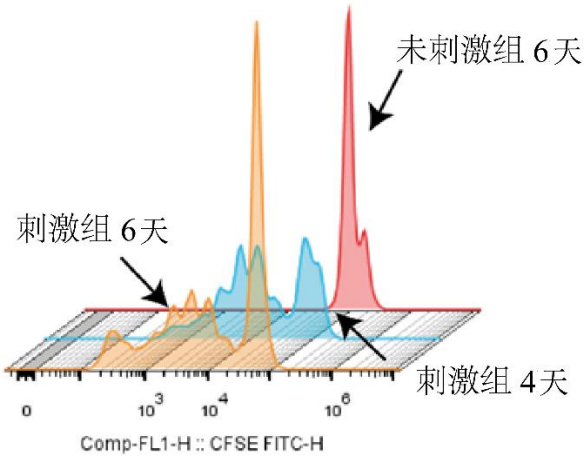

图 4 CFSE 标记检测示例图

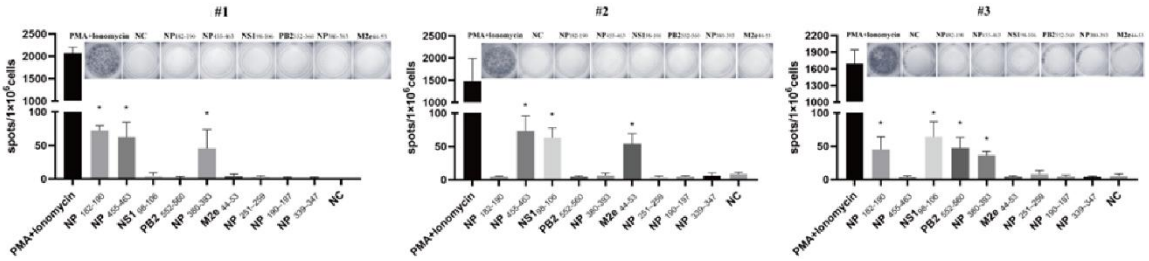

图 5 ELISpot 检测表位刺激 T 细胞效应应答阳性判定示例图

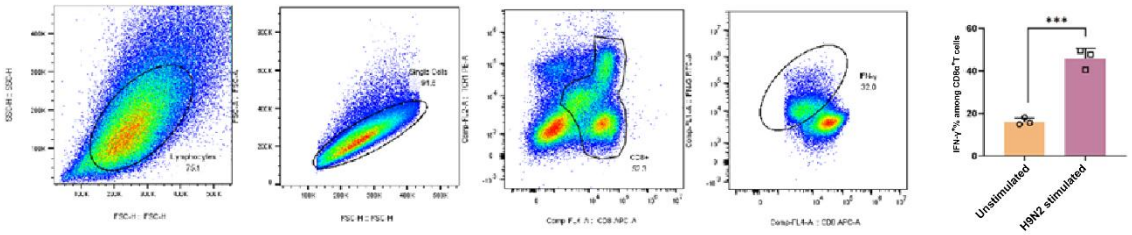

图 6 ICS 检测特异性家禽 T 细胞亚类应答示例图

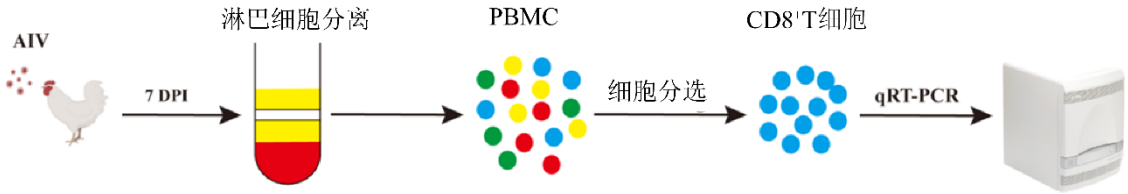

图 7 流式细胞术分选目的细胞亚群流程示意图

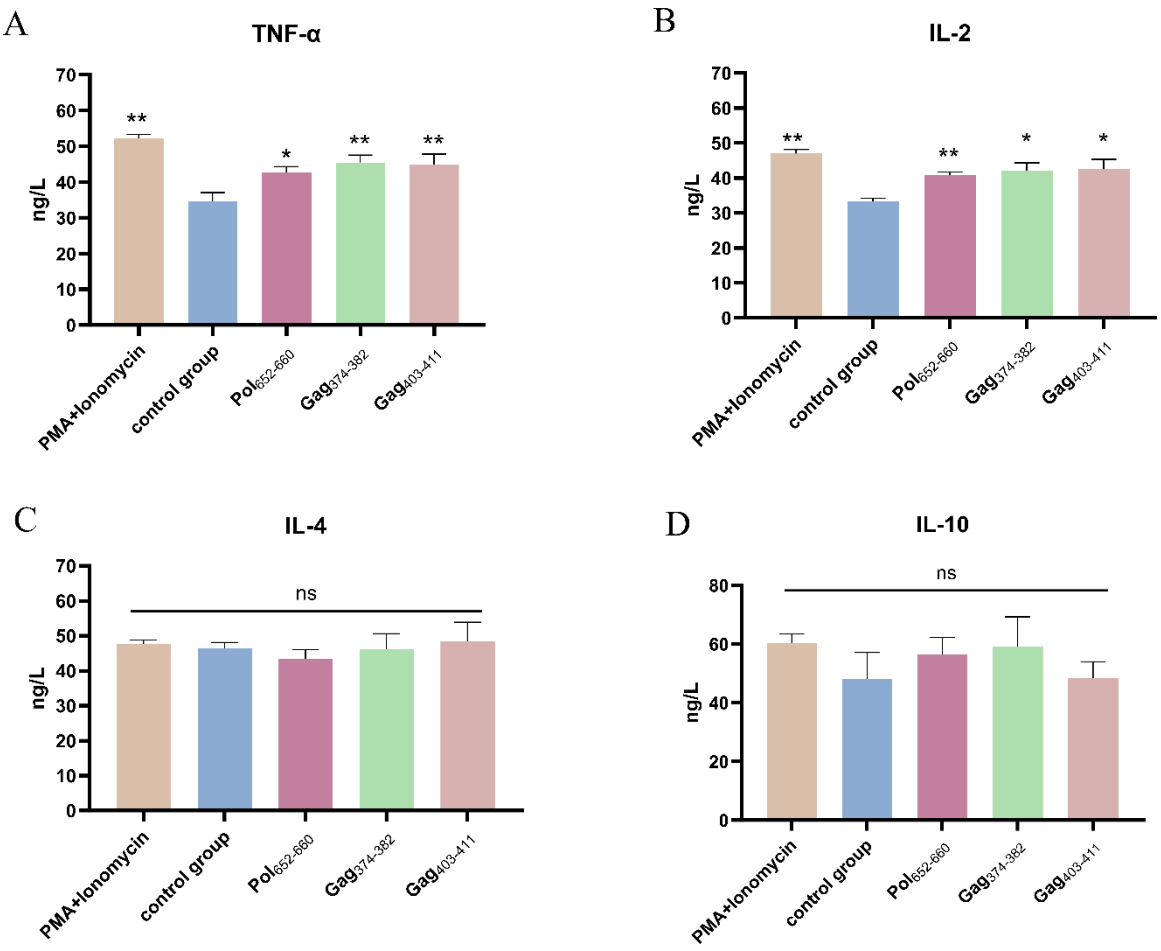

图 8 ELISA 检测表位刺激抗原特异性家禽 T 细胞 Th1 和 Th2 相关蛋白的表达示例图

附 录 B
（资料性）
鸡中免疫相关基因的实时荧光 RT-PCR 引物序列

目的基因	序列（5’- 3’）	GenBank 登录号
GAPDH 上游引物	GAACATCATCCCAGCGTCCA	NM_204305.1
GAPDH 下游引物	CGGCAGGTCAGGTCAACAAC	
IFN-α 上游引物	GACAGCCAACGCCAAAGC	GU119896.1
IFN-α 下游引物	GTCGCTGCTGTCCAAGCATT	
IFN-β 上游引物	GCCCACACACTCCAAAACACTG	NM_001024836.1
IFN-β 下游引物	TTGATGCTGAGGTGAGCGTTG	
MDA5 上游引物	GGACGACCACGATCTCTGTGT	NM_001193638.1
MDA5 下游引物	CACCTGTCTGGTCTGCATGTTATC	
TLR3 上游引物	ACAATGGCAGATTGTAGTCACCT	NM_001011691.3
TLR3 下游引物	GCACAATCCTGGTTTCAGTTTAG	
TLR7 上游引物	TCTGGACTTCTCTAACAACA	NM_001011688.2
TLR7 下游引物	AATCTCATTCTCATTCATCATCA	
ISG12-2 上游引物	TCAATGGGTGGCAAAGGAG	NM_001001296.5
ISG12-2 下游引物	TACAGGGAGAGCAAAGAAGAGAAGA	
OASL 上游引物	AGATGTTGAAGCCGAAGTACCC	NM_205041.1
OASL 下游引物	CTGAAGTCCTCCCTGCCTGT	
IFIT5 上游引物	CAGAATTTAATGCCGGCTATGC	XM_421662.4
IFIT5 下游引物	TGCAAGTAAAGCCAAAAGATAAGTGT	
MX1 上游引物	AAGCCTGAGCATGAGCAGAA	NM_204609.1
MX1 下游引物	TCTCAGGCTGTCAACAAGATCAA	
Granzyme A 上游引物	ACTCATGTCGAGGGGATTCA	NM_204457.1
Granzyme A 下游引物	TGTAGACACCAGGACCACCA	
Granzyme K 上游引物	CGGGAAGCAACTGTTGAAAT	XM_423832
Granzyme K 下游引物	GAGTCTCCCTTGCAAGCATC	
Perforin 上游引物	ATGGCGCAGGTGACAGTGA	XM_425355
Perforin 下游引物	TGGCCTGCACCGGTAATTC	
IFN-γ 上游引物	CCTCCAACACCTCTTCAACATG	X92479
IFN-γ 下游引物	TGGCGTGCGGTCAAT	
TNF-α 上游引物	GCTGTTCTATGACCGCCCAGTT	NM_204267.1

TNF-α 下游引物	AACAACCAGCTATGCACCCCA	
IL-1β 上游引物	GGTCAACATCGCCACCTACA	NM_204524.1
IL-1β 下游引物	CATACGAGATGGAAACCAGCAA	
IL-2 上游引物	GCTAATGACTACAGCTTATGGAGCA	AF000631.1
IL-2 下游引物	TGGGTCTCAGTTGGTGTGTAGAG	
NK lysin 上游引物	GATGGTTCAGCTGCGTGGGATGC	DQ186291
NK lysin 下游引物	CTGCCGGAGCTTCTTCAACA	
PARP 上游引物	ATTGTGGAGGAGCTGGGAGGAA	NM_205263
PARP 下游引物	AGGCTTGCTGCACTTCCCATC	
IL-4 上游引物	TCGAGGAGTGACGGGTG	AJ621249.1
IL-4 下游引物	ACTATCCGGATGCTCTCCATC	
IL-13 上游引物	CTGCCCTTGCTCTCCTCTGT	AJ621250.1
IL-13 下游引物	CCTGCACTCCTCTGTTGAGCTT	
IL-5 上游引物	GGAACGGCACTGTTGAAAAATAA	AJ621252.1
IL-5 下游引物	TTCTCCCTCTCCTGTCAGTTGTG	
IL-10 上游引物	AGCAGATCAAGGAGACGTTC	NM_001004414.2
IL-10 下游引物	ATCAGCAGGTACTCCTCGAT	
CXCLi1 上游引物	AACTCCGATGCCAGTG	NM_205018.1
CXCLi1 下游引物	TTGGTGTCTGCCTTGT	
CXCLi2 上游引物	CATCATGAAGCATTCCATCT	NM_205498.1
CXCLi2 下游引物	CTTCCAAGGGATCTTCATTT	
IL-6 上游引物	AAATCCCTCCTCGCCAATCT	AJ309540.1
IL-6 下游引物	CCCTCACGGTCTTCTCCATAAA	
TGF-β3 上游引物	TCTTTACATTGACTTCCGAC	NM_205454.1
TGF-β3 下游引物	TCCTCCCAACATAGTACAAG	