



中华人民共和国国家标准

GB/T 14927.2—2008
代替 GB/T 14927.2—2001

实验动物 近交系小鼠、大鼠免疫标记检测法

Laboratory animal—
Immunological marker of inbred mice and rats

2008-12-10 发布

2009-03-01 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

GB/T 14927 共分 2 个部分：

——第 1 部分为《实验动物 近交系小鼠、大鼠生化标记检测法》；

——第 2 部分为《实验动物 近交系小鼠、大鼠免疫标记检测法》。

本部分为 GB/T 14927 的第 2 部分。

本部分自实施之日起，代替 GB/T 14927.2—2001《实验动物 近交系小鼠、大鼠皮肤移植检测法》。

本部分与 GB/T 14927.2—2001 相比主要技术差异如下：

- a) 修订实验动物近交系小鼠、大鼠皮肤移植法部分内容；
- b) 增加小鼠 H-2 单倍型微量细胞毒检测法；
- c) 本部分名称修改为“实验动物 近交系小鼠、大鼠免疫标记检测法”。

本部分附录 A 为资料性附录。

本部分由全国实验动物标准化技术委员会提出并归口。

本部分由全国实验动物标准化技术委员会负责起草。

本部分主要起草人：邢瑞昌、刘双环、马丽颖、岳秉飞、鲍世民。

本部分所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB/T 14927.2—1994, GB/T 14927.2—2001。

实验动物

近交系小鼠、大鼠免疫标记检测法

1 范围

GB/T 14927 的本部分规定了近交系小鼠、大鼠皮肤移植术法和近交系小鼠 H-2 单倍型(Haplotype)检测方法。

本部分近交系小鼠、大鼠皮肤移植术法适用于近交系小鼠和大鼠在培育过程中遗传纯度的检查以及近交系小鼠和大鼠在繁殖饲养过程中的遗传监测。近交系小鼠 H-2 单倍型(Haplotype)检测方法适用于近交系小鼠培育和繁殖饲养过程中的遗传监测,主要检测 H-2 复合体 D 区和 K 区的抗原分型。

2 近交系小鼠和大鼠皮肤移植术法

2.1 技术原理

移植体在同一近交系中可以被互相接受,即同系移植(isograft)是成功的。

移植体在不同近交系中互相排斥,亦即同种移植(allograft)是不成功的。

F1 代动物可以接受任何一个双亲的组织移植体,双亲则不能接受 F1 代的移植体。

F1 代动物可以接受 F2 代以后各代动物的移植体。

亲本品系可以接受某些 F2 代以后各代动物的移植体,但是绝大部分被排斥。

本部分采用背部皮肤移植法和尾部皮肤移植法。两种方法原理相同,并具有同等标准效力。

2.2 背部皮肤移植法

2.2.1 设备和材料

2.2.1.1 固定板(18 cm×12 cm)。

2.2.1.2 戊巴比妥钠(医用)。

2.2.1.3 医用橡皮膏。

2.2.1.4 医用凡士林。

2.2.1.5 粉剂青霉素 G 钠(80 万 U,人或兽用)。

2.2.1.6 3%碘酒棉球。

2.2.1.7 75%酒精棉球。

2.2.1.8 眼科剪刀。

2.2.1.9 眼科镊子。

2.2.1.10 一次性注射器(1 mL)。

2.2.1.11 纱布(剪成 40 mm 长,25 mm 宽若干条;厚 2 层~3 层若干块,其上涂医用凡士林及粉剂青霉素 G 钠)。

2.2.1.12 脱脂棉做成的棉球。

2.2.1.13 将手术器材置于高压锅内 121 ℃、40 min 高压灭菌。

2.2.2 操作步骤

2.2.2.1 随机取同性别 4 周龄~8 周龄的动物 10 只,动物可来自基础群或血缘扩大群。

2.2.2.2 每只动物分别编号并称取体重,详细记录品系名称、性别、出生年月日、谱系及其他特征。

2.2.2.3 用无菌生理盐水配制 0.7%戊巴比妥钠溶液。

2.2.2.4 采用腹腔注射 0.7%戊巴比妥钠溶液麻醉动物。小鼠每 10 g 体重注射 0.1 mL,大鼠每 20 g

体重注射 0.1 mL。因不同品系动物对麻醉剂敏感性不同,注射量可适当增减(手术时室温应控制在 25℃~28℃之间)。

2.2.2.5 待动物麻醉失去知觉后,将其背部朝上放在固定板上,固定动物,剪去被毛,并用 3%碘酒棉球和 75%酒精棉球消毒。

2.2.2.6 在背部剪下直径 5 mm~10 mm 的皮肤左右各一块(其中一块用做自体移植,另一块用做异体移植)。

2.2.2.7 将剪好的皮片翻转过来放入带少量生理盐水的双碟(直径为 6 cm)中,用眼科剪刀,轻轻地切去皮下组织至真皮,然后放在无菌生理盐水中冲洗一下。

2.2.2.8 两只动物的皮片,除左侧皮片做自体移植外,右侧皮片循环交换,逆毛方向移植并使之吻合。

2.2.2.9 覆盖涂过凡士林和青霉素 G 钠的纱布块,3 层~4 层,用 1 cm 宽橡皮膏固定,松紧适度。

2.2.2.10 手术结束待动物苏醒后,把动物放入鼠盒内,并挂上标记卡片,10 d 后拆除包扎。

2.2.3 结果观察

2.2.3.1 拆包后,发现皮片干瘪、脱落则为技术失败。如皮片脱痂,手术部位平整、一周后有新毛长出则为手术成功。对照自体移植,技术失败率不得大于 10%。

2.2.3.2 如果皮片在 2 周~3 周内脱落,则为急性排斥。遗传污染通常引起急性排斥。

2.2.3.3 如果皮片在 3 周脱落,则为慢性排斥。移植后有否慢性排斥至少观察 100 d,遗传突变通常引起慢性排斥。

2.2.3.4 如果对结果怀疑,则要进行重新移植,可以使用一批新的动物,也可以使用已做过移植但对结果产生怀疑的动物。如果是后者,则排斥更迅速、更典型。

2.3 尾部皮肤移植法

2.3.1 设备和材料

2.3.1.1 11 号手术刀柄。

2.3.1.2 11 号手术尖刀片。

2.3.1.3 玻璃套管(直径 8 mm,大鼠可适当大些)。

2.3.1.4 其他材料见 2.2.1。

2.3.2 操作步骤

2.3.2.1 随机取同性别 4 周龄~8 周龄的动物 10 只,动物可来自于基础群、血缘扩大群或生产群。

2.3.2.2 每只动物分别编号并称取体重,详细记录品系名称、性别、出生年月日、谱系及其他特征。

2.3.2.3 用无菌生理盐水配制 0.7%戊巴比妥钠溶液。

2.3.2.4 采用腹腔注射麻醉 0.7%戊巴比妥钠溶液动物,小鼠每 10 g 体重注射 0.1 mL,大鼠每 20 g 体重注射 0.1 mL。因不同品系动物对麻醉剂敏感性不同,注射量可适当增减(手术时室温应控制在 25℃~28℃之间)。

2.3.2.5 待动物麻醉失去知觉后,将 5 只一组按顺序采取仰卧式放在一块滤纸上,并用 3%碘酒棉球和 75%酒精棉球消毒鼠尾。

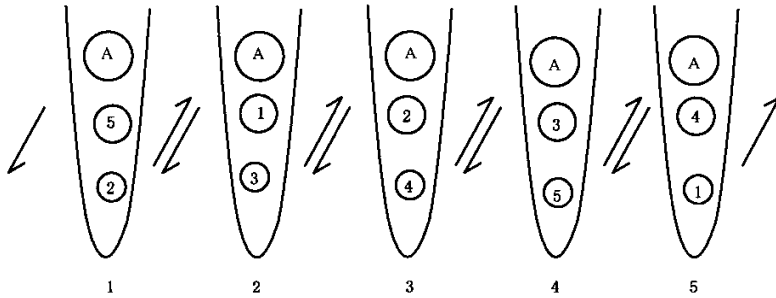
2.3.2.6 用左手食指按住动物尾根,左手拇指按住尾尖,固定鼠尾并使其微微伸展,然后右手持解剖刀,刃面朝上,与尾部皮肤成 20°~30°夹角,在尾静脉上部或两条尾静脉之间,在离尾部 5 mm 处削下一片宽约 2 mm~3 mm,长约 7 mm~8 mm 的皮肤,其厚度前者以没有严重出血,后者能以暴露出白色的肌腱但又不割伤血管为宜。

2.3.2.7 右手将刀片逆时针方向交给左手,附着在刀片上的皮片相应转 180°,将皮片用眼科镊子取下贴在原创面上,并尽量使其吻合,用一小片滤纸覆盖,再轻轻按压一下,然后取掉滤纸片,该移植作为自体移植对照。

2.3.2.8 按照 2.3.2.6 和 2.3.2.7 步骤,完成另 4 只动物的自体移植对照。

2.3.2.9 按照 2.3.2.6 和 2.3.2.7 步骤,参照皮肤移植相互循环系统图示,进行循环皮肤移植。亦即

前边鼠的第三片皮和后边相邻鼠的第二片皮进行相互交换植皮,具体操作见图 1。



注: A 表示自体移植对照;圆圈中的阿拉伯数字表示编号小鼠供体的皮片。

图 1 皮肤移植相互循环系统

2.3.2.10 取五支玻璃套管,分别轻轻套入动物尾巴至根部 3 mm 处,用医用胶布在尾巴远端靠近套管处将尾巴粘住,胶布往返粘贴 2 圈~3 圈,使套管可做轻微上下活动但不脱落。

2.3.2.11 套好玻璃管后,用落地手术灯照射动物大约 15 min~30 min。然后将动物仰躺着放入鼠盒中挂上标记卡片。

2.3.2.12 24 h 后取下套管,此时可看到皮片已粘在创面上。

2.3.3 结果观察

2.3.3.1 皮片在第一周内苍白、干瘪、脱落,则为技术失败。对照自体移植,技术失败率不得大于 10%。

2.3.3.2 皮片在第 2 周至第 3 周内发炎、水肿、坏死、结痂直至脱落,则为急性排斥。遗传污染通常引起急性排斥。

2.3.3.3 皮片在第 3 周至第 9 周内逆毛逐渐脱落,直至无毛;或者因排斥留下凹陷疤痕,都为慢性排斥。遗传突变通常引起慢性排斥。

2.3.3.4 皮片在 100 d 的观察期内,始终有逆毛,则为永久接受的标志。

2.3.3.5 如果对结果有怀疑,则要进行重新移植,以得出明确结果。

3 近交系小鼠 H-2 单倍型检测方法——微量细胞毒法

3.1 技术原理

在免疫遗传学中,能引起强烈移植排斥反应的抗原系统称为主要组织相容性抗原系统。小鼠的主要组织相容性原系统称为 H-2 复合体(major histocompatibility complex, H-2 complex),是定位于第 17 号染色体上的一个区段。不同品系的近交系小鼠,其 H-2 复合体组成不同,表现在 H-2 单倍型的不同。H-2 单倍型可以通过抗原抗体反应进行判别。

单克隆抗体能够特异性地与抗原进行反应,具有专一性,能够识别出对应的抗原物。利用 H-2 复合体 D 区和 K 区所对应的单抗,通过微量细胞毒法可以判定 D 区和 K 区的类型。

3.2 设备与材料

3.2.1 单克隆抗体

纯化非标记的单克隆抗体 H-2Db(27-11-13)、H-2Dd(34-5-8S)、H-2Dk(15-5-5.3)、H-2Kk(16-3.22.4)。

3.2.2 小牛血清。

3.2.3 补体制备

2 周龄~3 周龄新西兰仔兔,取动脉血,4 °C 冰箱静置 12 h,3 000 r/min 离心 15 min 分离血清,筛选不致小鼠脾细胞死亡的兔血清,分装,-70 °C 低温冰箱保存。

3.2.4 PBS pH7.2

Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	1.27 g
KH ₂ PO ₄	0.21 g
NaCl	3.40 g
蒸馏水	至 500 mL

3.2.5 Hank's 液

NaCl	8.00 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.41 g
KCl	0.40 g
KH ₂ PO ₄	0.10 g
NaHCO ₃	1.27 g
葡萄糖	2.00 g
蒸馏水	至 100 mL

3.2.6 伊红染色液(6%)

曙红 B(水溶性) Eosin B	0.6 g
蒸馏水	至 10 mL

3.2.7 甲醛溶液(10%)

甲醛	1 mL
蒸馏水	至 10 mL

3.2.8 离心机:500 r/min~4 000 r/min 离心机。

3.2.9 倒置显微镜:低倍。

3.2.10 37 °C 恒温水浴箱。

3.3 操作

3.3.1 脾细胞的制备

3.3.1.1 取待检小鼠脾剥去脂肪等附着物。

3.3.1.2 置于盛有 1 mL 10% 小牛血清(9 mL PBS, 1 mL 小牛血清)的平皿中,用小镊子撕碎。

3.3.1.3 将此混合物转移至离心管中,再用 1 mL 10% 小牛血清清洗平皿转移至同一离心管中,静置 15 min。

3.3.1.4 吸上清于另一离心管中,弃去沉淀。

3.3.1.5 离心上清液,3 000 r/min 离心 5 min。

3.3.1.6 弃掉上清液,保留沉淀。在沉淀中加入 4.5 mL 蒸馏水用吸管充分吸打搅匀,从加入蒸馏水时严格计时,40 s 后加入 0.5 mL Hank's 液,用吸管充分吸打搅匀,静置 10 min。

3.3.1.7 吸上清于另一离心管中,弃掉下部沉淀团块,离心上清液,3 000 r/min 离心 5 min。

3.3.1.8 弃掉上清液,保留沉淀。在沉淀中加入 0.5 mL 20% 小牛血清(8 mL PBS, 2 mL 小牛血清)。

3.3.1.9 细胞计数,使细胞终浓度为 $1 \times 10^6 / \text{mL} \sim 5 \times 10^6 / \text{mL}$ 。

3.3.2 细胞反应程序

3.3.2.1 采用 2.0 mL 离心管,每一动物品系均设立空白对照和补体对照。

3.3.2.2 每管中加入 20 μL 充分摇匀的细胞悬液,然后加入 20 μL 抗体(对照管中只加 20% 小牛血清)充分摇匀,37 °C 水浴中保温 15 min。

3.3.2.3 每管加 30 μL 补体(用 20% 小牛血清 2 倍稀释),空白对照只加 20% 小牛血清,37 °C 水浴中反应 30 min~40 min。

3.3.2.4 每管中加入 20 μL Eosin(伊红)染色液(6% Eosin 用 20% 小牛血清等倍稀释)37 °C 保温 10 min。

3.3.2.5 加入 20 μL 10% 甲醛(固定液)以提高实验结果的稳定性。

3.3.2.6 摇匀,从每管中取细胞悬液 10 μL 加在细胞板上,在倒置显微镜下观察结果。

3.4 实验结果评定

3.4.1 细胞形态判别

阳性细胞(死亡细胞)体积较大,伊红着色后失去折光性,阴性细胞(仍存活细胞)不着色,体积较小,而有折光性。

3.4.2 计算公式

$$\text{细胞死亡率} = \frac{\text{死细胞数}}{\text{全部细胞数}} \times 100\% \quad \dots\dots(1)$$

$$\text{细胞毒指数} = \frac{\text{实验组淋巴细胞死亡率}(\%) - \text{阴性对照组淋巴细胞死亡率}(\%)}{100\% - \text{阴性对照组淋巴细胞死亡率}(\%)} \quad \dots\dots(2)$$

3.4.3 判别标准

H-2 单抗的细胞毒指数大于 0.70,判为同一单倍型。常用近交系小鼠的 H-2 单倍型参见附录 A。

附 录 A
(资料性附录)

近交系小鼠 H-2 单倍型

常用近交系小鼠 H-2 单倍型见表 A.1。

表 A.1 常用近交系小鼠 H-2 单倍型

品系	H-2D	H-2K	H-2 单倍型
129	b	b	b
615	k	k	k
C3H	k	k	k
C57BL/6	b	b	b
C57BL/10	b	b	b
FVB	b	b	b
TA1	b	b	b
TA2	b	b	b
T739	b	b	b
BALB/c	d	d	d
DBA/2	d	d	d
Scid	d	d	d