



中华人民共和国国家标准

GB/T 14926.50~14926.55—2001

实验动物 微生物学检测方法(3)

Laboratory animal—Microbiological examination methods

2001-08-29 发布

2002-05-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

目 录

GB/T 14926.50—2001	实验动物	酶联免疫吸附试验	1
GB/T 14926.51—2001	实验动物	免疫酶试验	5
GB/T 14926.52—2001	实验动物	免疫荧光试验	9
GB/T 14926.53—2001	实验动物	血凝试验	12
GB/T 14926.54—2001	实验动物	血凝抑制试验	15
GB/T 14926.55—2001	实验动物	免疫酶组织化学法	19

前 言

本标准修订了GB/T 14926.18—1994《实验动物 淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒检测方法》中的免疫酶试验方法,将其作为一个独立标准列出。

本标准由中华人民共和国科学技术部提出并归口。

本标准起草单位:中国实验动物学会。

本标准主要起草人:贺争鸣。

1 范围

本标准规定了免疫酶试验(IEA)所用试剂、器材和操作步骤等。
本标准适用于实验动物病毒抗体的检测。

2 原理

含有病毒抗原的细胞固定于玻片上,遇相应抗体形成抗原抗体复合物。此抗原抗体复合物仍保持其抗原活性,可与相应的第二抗体酶结合物结合,遇酶底物产生颜色反应。在普通显微镜下,根据颜色的反应判定结果。

3 主要试剂与器材

3.1 试剂

3.1.1 抗原片

3.1.1.1 抗原片的制备

将病毒接种敏感细胞(表1),待细胞出现病变或确知细胞内含有丰富的病毒抗原后,用胰酶消化分散细胞,PBS洗涤三次,最后用适量PBS悬浮细胞。将细胞悬液滴于玻片孔内。同时消化不感染病毒的同批同种细胞,滴加同一玻片另一孔内,作为正常细胞对照。孔内滴加的细胞以细胞铺开、不重叠为宜。室温干燥后,冷丙酮(4℃)固定10 min。用蒸馏水漂洗后充分干燥,置于-20℃备用。

3.1.1.2 抗原片的鉴定

每批抗原片在使用前,用相应的阳性血清和阴性血清进行鉴定。鉴定方法可用IEA或免疫荧光试验。在阴性血清与正常细胞和病毒感染细胞反应无色;阳性血清与正常细胞反应无色,而与病毒感染细胞呈棕褐色,且阳性细胞数达30%~50%时,此批抗原片可以使用。

3.1.2 酶结合物

抗小鼠、大鼠、地鼠、豚鼠、兔、犬或猴IgG抗体辣根过氧化物酶结合物用于检查相应动物的血清抗体。葡萄球菌蛋白A(SPA)辣根过氧化物酶结合物可代替抗小鼠、豚鼠、兔、犬和猴IgG抗体辣根过氧化物酶结合物使用。

3.1.3 阳性血清

用病毒抗原免疫清洁或SPF级小鼠、大鼠、豚鼠、地鼠或普通级兔、犬、猴所获得的抗血清;或自然感染恢复后的犬、猴血清。

3.1.4 阴性血清

清洁或SPF级小鼠、大鼠、豚鼠、地鼠血清;或确认无相应病毒感染的兔、犬、猴血清。

3.1.5 PBS(0.01 mol/L,pH7.4)

氯化钠	8 g
氯化钾	0.2 g

磷酸二氢钾	0.2 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2.83 g
蒸馏水	加至 1 000 mL

3.1.6 底物溶液(现用现配)

3,3'-二氨基苯胺盐酸盐(DAB)	40 mg
PBS(0.01 mol/L, pH7.4)	100 mL
丙酮	5 mL
33%过氧化氢	0.1 mL

3.2 器材

3.2.1 普通显微镜。

3.2.2 印有 10~40 个小孔的玻片。

3.2.3 微量加样器,容量 5~50 μL 。

3.2.4 恒温水浴箱。

4 操作步骤

4.1 取出抗原片,室温干燥后,滴加适当稀释的待检血清和阴性、阳性血清,每份血清加两个病毒细胞孔和一个正常细胞孔,置湿盒内,37℃ 30 min。

4.2 PBS 洗三次,每次 5 min,室温干燥。

4.3 滴加适当稀释的酶结合物,置湿盒内,37℃ 30 min。

4.4 PBS 洗 3 次,每次 5 min。

4.5 将玻片放入底物溶液中,在室温下显色 5~10 min。PBS 漂洗 2 次,再用蒸馏水漂洗 1 次。

4.6 吹干后,在光镜下判定结果。

5 结果判定

在阴性、阳性对照血清成立的情况下:即阴性血清与正常细胞和病毒感染细胞反应无色;阳性血清与正常细胞反应无色,与病毒感染细胞呈棕褐色,即可判定结果。

5.1 待检血清与正常细胞和病毒感染细胞反应均呈无色,判为阴性。

5.2 待检血清与正常细胞反应呈无色,而与病毒感染细胞反应呈棕褐色,判为阳性。根据颜色深浅可判为+~++++。

表 1 IEA 细胞抗原片的制备

病毒	敏感细胞	收获时间,d	病变	涂片制备
HV	E6	7~10	—	分散细胞涂片,固定鉴定,保存
LCMV	Vero	7~10	++	
Ect.	BHK21	2~3	+++~++++	
MHV	DBT,L929	1~2	+++~++++	
Sendai	BHK21	2~4	+++~++++	
PVM	BHK21	5~7	++	
Reo3	BHK21	3~4	+++~++++	
TMEV	BHK21	4~5	+++~++++	
MAd	MK	2~4	+++~++++	
MVM	RE,ME	7~12	+++~++++	
Polyoma	ME	10~12	+++~++++	
RCV	RK	2~3	+++~++++	
KRV	RE	7~12	+++~++++	

表 1(完)

病毒	敏感细胞	收获时间,d	病变	涂片制备
H-1	RE	7~12	++~++++	分散细胞涂片,固定鉴定,保存
SA11	MA-104	2~3	++~++++	
CDV	Vero	5~7	++~++++	
BVirus	Vero	1~2	+++	
SPV	BHK21	1~2	++~++++	

注: MK-小鼠肾细胞;ME-小鼠胚细胞;RK-大鼠肾细胞;RE-大鼠胚细胞。