



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》中的免疫荧光试验方法,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

本标准规定了免疫荧光试验(IFA)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(组织培养细胞或动物组织细胞)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荧光素结合物结合。荧光素在紫外光或蓝紫光的照射下,可激发出可见的荧光。因此,在荧光显微镜下以荧光的有无和强弱判定结果。

3 主要试剂与器材

3.1 试剂

3.1.1 抗原片的制备

将病毒接种于敏感细胞上(见表1),待细胞出现病变或确知细胞内含有丰富的病毒抗原后,用胰酶消化下细胞,PBS洗涤三次,用适量PBS悬浮细胞,将细胞悬液滴于玻片孔中。同时消化未感染病毒的同批细胞,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。PBS漂洗后,充分干燥,置于-20℃备用。在-20℃条件下可保存一年。

3.1.2 羊或兔抗小鼠、大鼠、地鼠、豚鼠、兔、犬或猴IgG异硫氰酸荧光素结合物,使用时用含0.01%~0.02%伊文思蓝PBS稀释至适当浓度。

3.1.3 阳性血清

用病毒抗原免疫清洁或SPF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 50%甘油PBS

甘油	5 mL
PBS(0.01 mol/L, pH7.4)	5 mL

3.2 器材

- 3.2.1 荧光显微镜。
 3.2.2 超净工作台。
 3.2.3 低温冰箱。
 3.2.4 37℃培养箱。
 3.2.5 恒温水浴箱。
 3.2.6 印有10~40个小孔的玻片。
 3.2.7 微量加样器,容量5~50 μL。

4 操作步骤

- 4.1 取出抗原片,室温干燥后,将适当稀释的待检血清和阴性、阳性血清分别滴于抗原片上,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℃ 30~45 min。
 4.2 PBS洗三次,每次5 min,室温干燥。
 4.3 取适当稀释的荧光抗体,滴加于抗原片上,置湿盒内,37℃ 30~45 min。
 4.4 PBS洗三次,每次5 min。
 4.5 50%甘油PBS封片,荧光显微镜下观察。

5 结果判定

在阴性、阳性对照血清成立条件下,即阴性血清与正常细胞和病毒感染细胞反应均无荧光;阳性血清与正常细胞反应无荧光,与病毒感染细胞反应有荧光反应,即可判定结果。

- 5.1 待检血清与正常细胞和病毒感染细胞均无荧光反应,判为阴性。
 5.2 待检血清与正常细胞反应无荧光,与感染细胞有荧光反应,判为阳性。根据荧光反应的强弱可判定为+~++++。

表1 IFA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
LCMV	Vero	7~10	++	分散细胞涂片,固定鉴定,保存
Ect.	BHK21	2~3	+++~++++	
MHV	DBT,L929	1~2	+++~++++	
Sendai	BHK21	2~3	+++~++++	
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	+++~++++	
H-1	RE	7~12	+++~++++	
SA11	MA-104	2~3	+++~++++	
SRV	Raji	10~14	+++~++++	
SIV	CM-174	10~14	+++~++++	
STLY-1	MT-4	10~14	+++~++++	

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。