



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 14926.24—1994《实验动物 小鼠肺炎病毒检测方法》中的血凝试验方法,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。

中华人民共和国国家标准

实验动物 血凝试验

GB/T 14926.53—2001

Laboratory animal—Haemagglutination test(HA)

1 范围

本标准规定了血凝试验(HA)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原的检测。

2 原理

某些病毒在一定的条件下,能够选择性地凝集某些动物红细胞,产生可见的凝集反应。

3 主要试剂与器材

3.1 试剂

3.1.1 血凝素

血凝素抗原除部分病毒(如痘类病毒)能与感染性颗粒分开外,大部分是与病毒的感染性颗粒相关,凡培养于鸡胚或组织培养中的病毒及其抗原物质,经离心除去沉淀,均可用作血凝试验的抗原(见表1、表2)。

表1 血凝素制备方法

病毒	细胞	收毒(d)	病变(+)	抗原处理	滴度(HA)	备注
KRV	RE	7~12	2~3	冻融2~3次,2 000 r/min	64~128	
H-1	RE	7~12	2~3	离心10~20 min,取上清	128	
CPV	FK81	3~5	3~4	离心10~20 min,取上清	>640	
ICHV	MDCK	3~4	3~4	培养物冻融后离心,取上清,经60℃水浴作用10~20 min	>1 280	
RV	BHK21	4~5	2~3	冻融2~3次,2 000 r/min 离心20 min取上清	>320	基础液中含0.2%~0.4%牛血清白蛋白

表2 血凝素制备方法

病毒	动物 (日龄)	接种途径 剂量	抗原取材	时间 (d)	抗原处理	滴度(HA)
TMEV	小鼠 (14~21)	ic0.02 mL	脑	5~7	研磨成10%悬液,冻化2~3次 1 000 r/min离心10 min,上清对 倍加0.5%胰酶,4℃可短期保存	128~512
Sendai	鸡胚(9)	尿囊0.2 mL	尿囊液	3	2 000 rpm离心10 min,取上清液	640
RHDV	兔	sc 2 mL	肝	2~4	研磨成10%悬液3 000 r/min离 心10 min取上清	8 190

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局2001-08-29批准

2002-05-01实施

3.1.2 红细胞悬液

根据不同病毒血凝所需敏感红细胞制备悬液,一般将血液保存于阿氏溶液内,使用前用 pH7.4 PBS 洗三次,再悬于 pH7.4 PBS 中。

3.1.3 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

3.1.4 阿氏溶液

葡萄糖	2.05 g
枸橼酸钠	0.8 g
枸橼酸	0.055 g
氯化钠	0.42 g
蒸馏水	100 mL

115℃灭菌 30 min,保存于 4℃。

3.2 器材

3.2.1 恒温培养箱。

3.2.2 微量振荡器。

3.2.3 微量血凝反应板(U型或V型)。

3.2.4 微量加样器(容量 5~50 μL)或微量稀释棒。

4 操作步骤

4.1 将血凝素用 PBS 做连续倍比稀释,每稀释度留 25 μL 于微量血凝板孔内。

4.2 每孔内再加 25 μL PBS 与 50 μL 红细胞悬液,摇匀。同时设立红细胞对照。

4.3 置所需温度作用 30~60 min。

5 结果判定

将出现血凝“++”的最高稀释度定为该血凝素的效价。

各孔血凝结果以++++、+++、++、+、-表示。

++++:红细胞一片凝集,均匀铺于孔底。

+++ :红细胞凝集基本同上,孔底有大圈。

++ :红细胞于孔底形成一个中等大的圈,四周有小凝块。

+ :红细胞于孔底形成一个小圈,四周有少许凝块。

- :红细胞完全不凝集,沉于孔底。