

中华人民共和国国家标准

GB/T 18448.2—2008
代替 GB/T 18448.2—2001

实验动物 弓形虫检测方法

Laboratory animal—Method for examination of *Toxoplasma gondii*

2008-12-03 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 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

GB/T 18448《实验动物》由 10 项实验动物寄生虫检测方法组成。

本部分为 GB/T 18448 的第 2 部分《实验动物 弓形虫检测方法》。

本部分自实施之日起代替 GB/T 18448.2—2001。

本部分与 GB/T 18448.2—2001 相比主要技术差异如下：

- a) 增加弓形虫酶联免疫吸附试验(ELISA)和免疫酶染色试验(IEA),将 PCR 检测方法列入附录内容,保留间接血凝试验(IHA)作为推荐方法之一;
- b) 将检测方法所需的“材料与试剂”和“检测步骤”分别叙述。

本部分附录 A 是规范性附录。

本部分由全国实验动物标准化技术委员会提出并归口。

本部分起草单位:全国实验动物标准化技术委员会。

本部分主要起草人:潘振业、屈霞琴、陈俏梅、李冠民、王彦平。

本部分所代替标准的历次版本发布情况为:

——GB/T 14926.34—1994,GB/T 18448.2—2001。

实验动物 弓形虫检测方法

1 范围

GB/T 18448 的本部分规定了实验动物弓形虫的检测方法和试剂等。

本部分适用于小鼠、大鼠、地鼠、豚鼠、兔、犬及猴等实验动物弓形虫的检测。

2 原理

根据免疫学原理,采用弓形虫抗原检测被检动物血清中的弓形虫抗体。

3 主要试剂和器材

3.1 试剂

3.1.1 ELISA 抗原

3.1.1.1 特异性抗原

弓形虫(RH株)速殖子腹腔接种清洁级以上实验小鼠(KM、ICR、BALB/c等均可),3 d~5 d后,以无菌生理盐水灌洗被接种小鼠的腹腔,收集含有虫体的小鼠腹腔液,3 000 r/min离心10 min,取沉淀,PBS洗3次。沉淀物加适量蒸馏水反复冻融5次,或用超声波处理后,10 000 r/min离心30 min,取上清液。上清液用葡聚糖凝胶G200进行纯化(柱内径×柱高:1.5 cm×60 cm),流速为0.2 mL/min。每管收集2 mL左右。共收集60管以上。分别测定每个收集管中蛋白在280 nm下的吸光度值。分离纯化后,出现2个蛋白峰;将第一峰各管合并,即为弓形虫特异性抗原(也称弓形虫可溶性抗原)。

3.1.1.2 正常抗原

以无菌生理盐水注射清洁级以上实验小鼠(与制备抗原的小鼠同品种或品系)腹腔,3 d~5 d后,以无菌生理盐水灌洗被注射小鼠腹腔,收集小鼠腹腔液,3 000 r/min离心10 min,取沉淀,PBS洗3次。沉淀物加适量蒸馏水反复冻融5次,或用超声波处理后,10 000 r/min离心30 min,取上清液,即为正常抗原。

3.1.2 抗原片

弓形虫RH株速殖子腹腔接种清洁级以上实验小鼠(KM、ICR、BALB/c等均可),3 d~5 d后处死,收取虫体,胰酶消化,以一定浓度涂片,充分晾干后冷丙酮固定,-20℃保存。

3.1.3 弓形虫抗原致敏绵羊红细胞

将绵羊红细胞与一定浓度的鞣酸液反应,制成鞣化红细胞,然后,用弓形虫可溶性抗原在适宜的条件下致敏鞣化红细胞,制成弓形虫抗原致敏绵羊红细胞。

3.1.4 正常对照绵羊红细胞。

3.1.5 阳性对照血清

自然感染弓形虫的相应动物抗体阳性血清,或弓形虫免疫血清。

3.1.6 阴性对照血清

确证无弓形虫感染的动物血清。

3.1.7 酶结合物

辣根过氧化物酶标记的抗小鼠、大鼠、地鼠、豚鼠、兔、犬和猴IgG抗体;或辣根过氧化物酶标记葡萄球菌蛋白A(SPA)。

3.1.8 荧光素结合物

异硫氰酸荧光素标记的抗小鼠、大鼠、地鼠、豚鼠、兔、犬和猴IgG抗体。

3.1.9 包被液(0.05 mol/L,pH 9.6)

碳酸钠	1.59 g
碳酸氢钠	2.93 g
蒸馏水	加至 1 000 mL

3.1.10 PBS(0.01 mol/L,pH 7.4)

氯化钠	8 g
氯化钾	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

3.1.11 洗涤液

PBS(0.01 mol/L,pH 7.4)	1 000 mL
Tween-20	0.5 mL

3.1.12 稀释液

含 1%牛血清白蛋白的 PBS。

3.1.13 磷酸盐-柠檬酸缓冲液(pH 5.0)

柠檬酸	3.26 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	12.9 g
蒸馏水	700 mL

3.1.14 ELISA 底物溶液

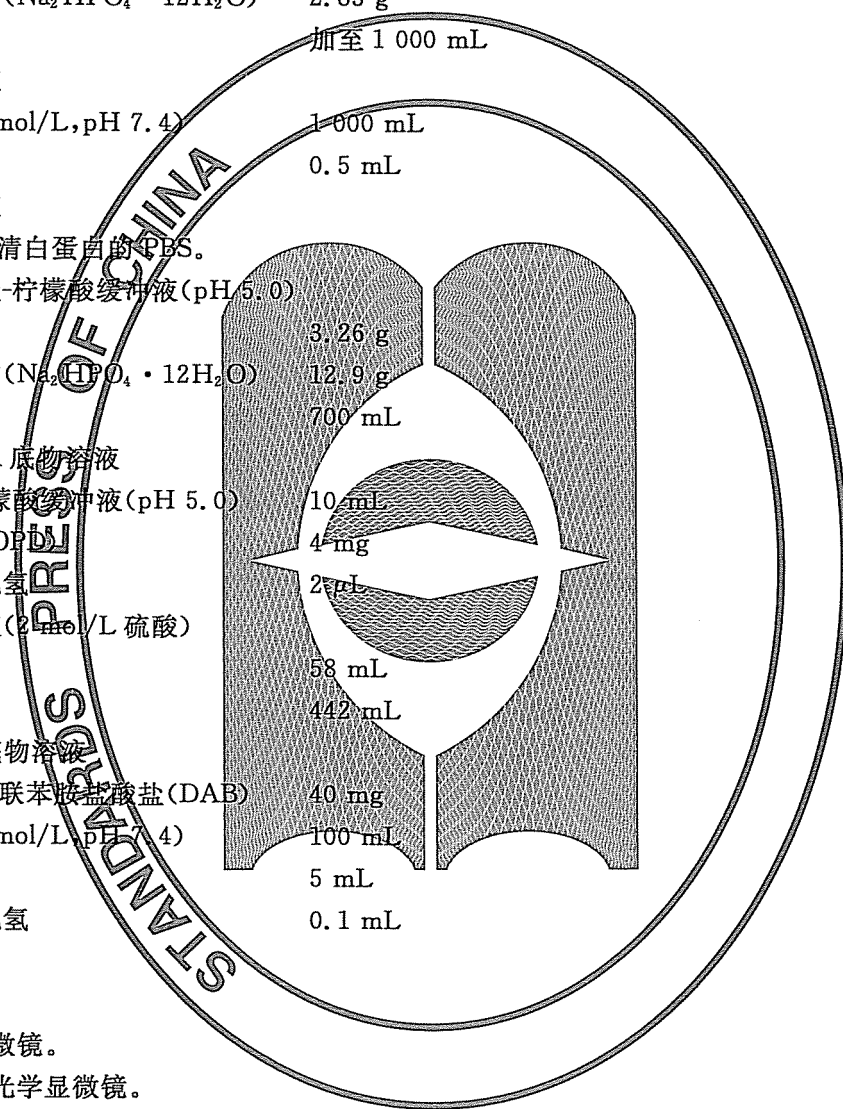
磷酸盐-柠檬酸缓冲液(pH 5.0)	10 mL
邻苯二胺(OPD)	4 mg
30%过氧化氢	2 μL

3.1.15 终止液(2 mol/L 硫酸)

硫酸	58 mL
蒸馏水	442 mL

3.1.16 IEA 底物溶液

3,3-二氨基联苯胺盐酸盐(DAB)	40 mg
PBS(0.01 mol/L,pH 7.4)	100 mL
丙酮	5 mL
30%过氧化氢	0.1 mL



3.2 器材

- 3.2.1 酶标仪。
- 3.2.2 荧光显微镜。
- 3.2.3 常规的光学显微镜。
- 3.2.4 37 °C 培养箱或水箱。
- 3.2.5 微量血凝反应板(U 型或 V 型)。
- 3.2.6 振荡器。
- 3.2.7 微量加样器(5 μL ~100 μL)。

4 检测方法

4.1 间接血凝法(IHA)

4.1.1 取样

4.1.1.1 采血约 1 mL(小鼠、大鼠、地鼠眶静脉窦采血;豚鼠心脏采血;兔耳部采血;犬和猴后肢静脉采

血),凝血试管斜放待凝,置4℃冰箱2h。

4.1.1.2 2h后,从冰箱中取出凝血试管,轻轻吸取血清移入另一试管中。

4.1.1.3 将分离出的血清置56℃水浴中灭活30min,备用。

4.1.2 加样

在微量反应板上,依次对每份血清进行倍比稀释,每份血清稀释两横排,每孔留量为25μL。同时设阳性对照、阴性对照和空白对照。

4.1.3 加致敏红细胞

第一横排滴加弓形虫致敏红细胞25μL,第二横排滴加正常对照绵羊红细胞25μL。将加好样品的微量反应板置振荡器上振荡3min~5min,使致敏红细胞与待检的稀释血清充分混合,置15℃~28℃室温下过夜后判定结果。

4.1.4 结果记录

在对照系统(阴性血清对照、阳性血清对照、空白对照)成立的条件下判定结果。

4.1.4.1 红细胞呈膜状均匀沉于孔底,中央无沉点或沉点小如针尖,记为“++++”。

4.1.4.2 红细胞虽呈膜状沉着,但颗粒较粗,中央沉点较大,记为“+++”。

4.1.4.3 红细胞部分呈膜状沉着,周围有凝集团点,中央沉点大,记为“++”。

4.1.4.4 红细胞沉集于中心,周围有少量颗粒状沉着物,记为“+”。

4.1.4.5 红细胞沉集于中心,周围无沉着物,分界清楚,记为“-”。

4.1.5 结果判定

出现“++++”的血清最高稀释倍数定为该间接血凝试验的凝集效价。小于或等于1:16判为阴性;1:32判为可疑;等于或大于1:64判为阳性。

4.2 酶联免疫吸附试验法(ELISA)

4.2.1 包被抗原

根据滴定的最适工作浓度,将特异性抗原和正常抗原分别用包被液稀释,每孔100μL,置37℃2h,4℃过夜。

4.2.2 洗涤液洗5次,每次3min,叩干。

4.2.3 加样

4.2.3.1 采血样约1μL/只(小鼠、大鼠、地鼠眶静脉采血;豚鼠心脏采血;兔耳部采血;犬和猴后肢静脉采血),凝血试管斜放待凝,置4℃冰箱2h至过夜。

4.2.3.2 2h后,从冰箱中取出凝血试管,轻轻吸取血清移入另一试管中。

4.2.3.3 将待检血清用稀释液做1:20稀释,分别加入两孔(特异性抗原孔和正常抗原孔),每孔100μL,同时做阴性、阳性对照血清和空白对照,置37℃1h~1.5h后,洗涤同上。

4.2.4 加酶结合物

用稀释液将酶结合物稀释成适当浓度,每孔加入100μL,置37℃1h~1.5h,洗涤同上。

4.2.5 加底物溶液

每孔加入新配制的底物溶液100μL,置室温,避光显色5min~10min。

4.2.6 终止反应

每孔加入终止液50μL。

4.2.7 测A值

在酶标仪上,于490nm处读出各孔A值。

4.2.8 结果判定

4.2.8.1 在对照系统(阴性血清对照、阳性血清对照、空白对照)成立的条件下判定结果。

4.2.8.2 同时符合下列3个条件者,判为阳性:

a) 待检血清与正常抗原和特异性抗原反应有明显的颜色区别;

b) 待检血清与特异性抗原反应的 A 值 ≥ 0.2 ;

c) 待检血清与特异性抗原反应的 A 值/阴性血清与特异性抗原反应的 A 值 ≥ 2.1 。

4.2.8.3 均不符合上述 3 个条件者,判为阴性;仅有 1 条~2 条符合者,判为可疑;需选用同一种方法或另一种方法重试。

4.3 免疫荧光试验法(IFA)

4.3.1 取出抗原片(3.1.2),置室温干燥或冷风吹干。

4.3.2 将待检血清(4.2.3.1~4.2.3.2)用 PBS 按 1:10 稀释后,滴于抗原片上,置湿暗盒内,37 °C 45 min。同时做阴性、阳性血清对照和空白对照。

4.3.3 PBS 漂洗 3 次~5 次,每次 3 min,室温干燥或冷风吹干。

4.3.4 将适当稀释的荧光抗体滴加于抗原片上,置湿暗盒内,37 °C 45 min。

4.3.5 PBS 漂洗 3 次~5 次,每次 3 min。

4.3.6 50%甘油 PBS 封片,荧光显微镜下观察。

4.3.7 结果判定:在对照系统成立的条件下,即阴性血清和 PBS 与抗原片上的弓形虫虫体反应均无荧光;阳性血清与弓形虫虫体反应有荧光,即可判定结果。

待检血清与弓形虫虫体反应无荧光,判为阴性。

待检血清与弓形虫虫体反应有荧光反应,判为阳性。根据荧光反应的强弱可判为+~++++。

4.4 免疫酶试验法(IEA)

4.4.1 取出抗原片(3.1.2),置室温干燥或冷风吹干。

4.4.2 将待检血清(4.2.3.1~4.2.3.2)用 PBS 按 1:10 稀释后,滴于抗原片上,置湿暗盒内,37 °C 45 min。同时做阴性、阳性血清对照和空白对照。

4.4.3 PBS 漂洗 3 次~5 次,每次 3 min,室温干燥或冷风吹干。

4.4.4 将适当稀释的酶结合物滴加于抗原片上,置湿暗盒内,37 °C 45 min。

4.4.5 PBS 漂洗 3 次~5 次,每次 3 min。室温干燥或冷风吹干。

4.4.6 将底物溶液滴加于抗原片上,置室温暗盒内,显色 5 min~10 min。PBS 漂洗 3 次,再用蒸馏水漂洗 1 次。

4.4.7 中性树脂封片,光学显微镜下观察。

4.4.8 结果判定:在对照系统成立的条件下,即阴性血清和 PBS 与抗原片上的弓形虫虫体反应均无色;阳性血清与弓形虫虫体反应呈棕褐色,即可判定结果。

待检血清与弓形虫虫体反应呈无色,判为阴性。

待检血清与弓形虫虫体反应呈棕褐色,判为阳性。根据颜色深浅可判为+~++++。

4.5 PCR 检测方法

见附录 A。

5 结果判定

待检样品用一种方法检测出现可疑或阳性时,应选用同一种或另一种方法重检,重检阳性则为阳性。

6 结果报告

根据判定结果,作出报告。

附 录 A
(规范性附录)
实验动物 弓形虫检测方法(PCR 法)

A.1 范围

本附录规定了实验动物弓形虫 PCR 检测方法。

本附录适用于小鼠、大鼠、地鼠、豚鼠、兔、犬及猴等实验动物弓形虫的检测。

A.2 原理

虫体 DNA 加热变性后,人工合成的两条特异性引物分别与虫体 DNA 两翼序列特异变性,在合适条件下,由耐热 DNA 聚合酶催化引物引导的虫体 DNA 合成(即延伸),完成热变性——复性——延伸的 PCR 循环,通过 30 次左右的循环扩增,可通过琼脂糖凝胶电泳检查虫体 DNA 特异性条带。

A.3 主要试剂和器材

A.3.1 试剂

A.3.1.1 血细胞洗涤液:若样品为全血,采用 0.83% NH_4Cl 溶液洗涤。

A.3.1.2 DNA 裂解液[10 mmol/L Tris(pH 7.4),10 mmol/L EDTA,150 mmol/L NaCl,0.4% SDS,100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蛋白酶 K]。

A.3.1.3 苯酚-三氯甲烷抽提液(苯酚:三氯甲烷为 1:1)。

A.3.1.4 TE 缓冲溶液(1 mL 1 mol/L Tris-His pH 8.0,0.2 mL 0.5 mol/L EDTA pH 8.0,总体积 100 mL)。

A.3.1.5 TBE 缓冲液。

A.3.1.6 *Taq* DNA 聚合酶。

A.3.1.7 引物

A.3.1.7.1 一次 PCR 引物 按 B1 基因序列设计

1. 上游引物:5'GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG3'(694 bp~714 bp)

2. 下游引物:5'TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC3'(887 bp~868 bp)

扩增产物为 194 bp。

A.3.1.7.2 套式 PCR 引物 按 P30 基因序列设计引物

P1 为 5'GCGAATTCATGTCAGATCCCCCT3'

P2 为 5'GTGGATCCTCACGCGACACAAGCT3'

P3 为 5'CGACAGCCGGTCATTCTC3'

P4 为 5'GCAACCAGTCAGCGTCGTCC3'

P1 和 P2 的预扩增产物为 889 bp,P3 和 P4 的预扩增产物为 520 bp。

A.3.1.8 $10\times$ PCR 反应缓冲液(含 MgCl_2 15 mmol/L)。

A.3.1.9 dNTP:各为 10 mmol/L。

A.3.1.10 阳性对照(模板 DNA):弓形虫 DNA 片段。

制备方法(有条件的实验室可参考):将 RH 株弓形虫速殖子接种小鼠腹腔,3 d~4 d 后处死。用 NS 洗腹腔,收集腹腔液,离心弃上清,沉淀悬浮于裂解液(含 SDS 和蛋白酶 K)中,55 $^{\circ}\text{C}$ 消化 2 h,再 100 $^{\circ}\text{C}$ 处理 10 min。虫体消化液用苯酚,三氯甲烷抽提数次,70%乙醇沉淀 DNA,再溶解于 TE 溶液内。

A. 3. 1. 11 阴性对照:蒸馏水或 TE 溶液。

A. 3. 1. 12 DNA marker。

A. 3. 1. 13 2%琼脂糖。

A. 3. 1. 14 0.5×TBE 电泳缓冲液。

A. 3. 1. 15 0.5 mg/mL 溴乙锭。

A. 3. 2 器材

A. 3. 2. 1 DNA 扩增仪。

A. 3. 2. 2 微量移液器。

A. 3. 2. 3 冷冻高速离心机。

A. 3. 2. 4 电泳仪。

A. 3. 2. 5 水浴锅。

A. 3. 2. 6 紫外检测仪。

A. 3. 2. 7 摄影器材。

A. 3. 2. 8 0.5 mL 和 1.5 mL 塑料离心管。

A. 4 操作步骤

A. 4. 1 待检标本的处理

A. 4. 1. 1 抽取待检动物的血液或腹腔液,以及相关组织。

A. 4. 1. 2 全血:取待检动物全血 0.2 mL,加入 5×体积的 0.83% NH_4Cl 中,冰浴 20 min,6 000 r/min 离心 5 min,弃上清,在细胞沉淀中再加入 1 mL 上述溶液,6 000 r/min 离心,重复 1 次~2 次(去除红细胞),在沉淀中加入 250 mL 裂解液。消化,提纯过程同模板 DNA 的制备。

A. 4. 1. 3 腹水:取待检动物腹水离心弃上清,在沉淀中加入 250 mL 裂解液,消化,提纯过程同模板 DNA 的制备。

A. 4. 1. 4 各种组织:取适量待检动物肝、脾、子宫、肾脏等制成匀浆,加入等体积裂解液,消化,提纯过程同模板 DNA 的制备。

A. 4. 2 PCR 实验

A. 4. 2. 1 一次 PCR

总体积 50 μL ,内含 10 mmol/L pH 8.3 Tris-HCl,50 mmol/L KCl,2 mmol/L MgCl_2 ,0.2 mmol/L dNTPs,样品 3 μL ~5 μL ,引物 1、引物 2 各 10 pmol。上述反应液先预变性,然后加入 *Taq* 酶 2 U,混匀。覆盖液体石蜡 50 μL ,进行扩增。PCR 反应条件:预变性为 94 $^\circ\text{C}$,3 min;94 $^\circ\text{C}$,30 s,60 $^\circ\text{C}$,30 s,72 $^\circ\text{C}$,30 s,41 个循环,最后 72 $^\circ\text{C}$,7 min。

A. 4. 2. 2 套式 PCR

第 1 次扩增:总体积 50 μL ,内含 10 mmol/L pH 8.3 Tris-HCl,50 mmol/L KCl_2 ,2 mmol/L MgCl_2 ,0.2 mmol/L dNTPs,样品 1 μL ~2 μL ,引物 P1 和 P2 各 10 pmol。上述反应液先预变性,然后加入 *Taq* 酶 2U,混匀,覆盖液体石蜡 50 μL 。第 2 次扩增:取第一次扩增产物 1 μL ~2 μL ,引物 P3 和 P4 各 10 pmol,其他同第 1 次扩增。巢式 PCR 反应参数:预变性为 94 $^\circ\text{C}$,3 min;94 $^\circ\text{C}$,1 min,55 $^\circ\text{C}$,1 min,72 $^\circ\text{C}$,2 min,30 个循环,最后 72 $^\circ\text{C}$,8 min。

A. 4. 3 扩增产物的检定

A. 4. 3. 1 一次 PCR:5 μL 扩增产物经 2%琼脂糖凝胶电泳(含 0.5 mg/mL 溴乙锭)分离,(0.5×TBE 电泳缓冲液电泳,电压 5 V/cm,1 h~1.5 h),在紫外灯检测仪观察是否有 194 bp 扩增条带。

A. 4. 3. 2 套式 PCR:第一次扩增后(同一次 PCR)产物,经第二次扩增后,电泳检测(同一次 PCR),在紫外灯检测仪观察是否有 520 bp 的扩增带。

A.5 结果判断

A.5.1 一次 PCR:在阳性、阴性对照成立的条件下,即模板 DNA 的扩增产物经电泳检测可见到194 bp 扩增条带,阴性对照的扩增产物经电泳检测未见到 194 bp 扩增时,可判定弓形虫检测结果。

琼脂糖凝胶电泳板在紫外灯检测仪上观察到 194 bp 扩增条带,弓形虫检测阳性。

琼脂糖凝胶电泳板在紫外灯检测仪上未观察到 194 bp 扩增条带,弓形虫检测阴性。

A.5.2 套式 PCR:在阳性、阴性对照成立的条件下,即模板 DNA 的第一次扩增产物经第二次扩增后,电泳检测,可以见到有 520 bp 的扩增带;阴性对照未见到相应扩增带,可判定弓形虫检测结果。

第一次扩增后产物经第二次扩增后见到有 520 bp 的扩增带,弓形虫检测阳性。

第一次扩增后产物经第二次扩增后未见到有 520 bp 的扩增带,弓形虫检测阴性。

A.6 注意事项

A.6.1 整个检测工作应遵循 PCR 实验室规范,加强安全防护,应有四个隔开的工作区域,分别从事试剂储存和准备、标本制备、扩增和扩增产物分析,以避免发生潜在的交叉污染。

A.6.2 整个检测工作应加强生物安全防护意识,特别是由虫蛛攻击小鼠产生阳性腹水,并制备模板 DNA 的工作,必须在生物安全防护 2 级的条件下进行。

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
实 验 动 物 弓 形 虫 检 测 方 法
GB/T 18448.2—2008

*

中 国 标 准 出 版 社 出 版 发 行
北 京 复 兴 门 外 三 里 河 北 街 16 号
邮 政 编 码 : 100045

网 址 www.spc.net.cn

电 话 : 68523946 68517548

中 国 标 准 出 版 社 秦 皇 岛 印 刷 厂 印 刷
各 地 新 华 书 店 经 销

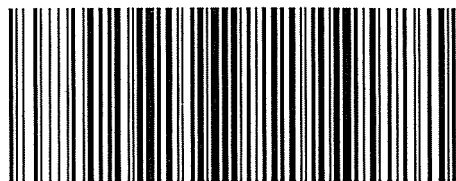
*

开 本 880×1230 1/16 印 张 0.75 字 数 14 千 字
2009 年 2 月 第 一 版 2009 年 2 月 第 一 次 印 刷

*

书 号 : 155066 · 1-35773 定 价 14.00 元

如 有 印 装 差 错 由 本 社 发 行 中 心 调 换
版 权 专 有 侵 权 必 究
举 报 电 话 : (010)68533533



GB/T 18448.2-2008