



# 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》中的酶联免疫吸附试验方法,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 酶联免疫吸附试验

GB/T 14926.50—2001

Laboratory animal—Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

### 1 范围

本标准规定了酶联免疫吸附试验(ELISA)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

包被于固相载体表面的已知抗原与待检血清中的特异性抗体结合形成免疫复合物。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。在酶的催化作用下底物发生反应,产生有色物质。颜色反应的深浅与待检血清中所含有的特异性抗体的量成正比。

### 3 主要试剂和器材

#### 3.1 试剂

##### 3.1.1 抗原

###### 3.1.1.1 特异性抗原

将病毒接种其敏感细胞培养增殖(表1),当细胞病变达+++~++++时收获,冻融三次或超声波处理后,低速离心去除细胞碎片,上清液再经超速离心浓缩后制成ELISA抗原。

###### 3.1.1.2 正常抗原

未接种病毒的相应细胞冻融破碎后,经低速离心去除细胞碎片而获得的上清液。

##### 3.1.2 酶结合物

ELISA法常用以下两类酶结合物。

3.1.2.1 辣根过氧化物酶标记羊或兔抗小鼠、大鼠、豚鼠、地鼠、兔、犬或猴IgG抗体。用于检测相应动物血清抗体。

3.1.2.2 辣根过氧化物酶标记葡萄球菌蛋白A(SPA)。用于检测小鼠、豚鼠、兔、犬和猴血清抗体。

##### 3.1.3 对照血清

###### 3.1.3.1 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。

###### 3.1.3.2 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。

##### 3.1.4 包被液(0.05 mol/L pH9.6)

碳酸钠	1.59 g
碳酸氢钠	2.93 g
蒸馏水	加至1 000 mL

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

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

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 洗涤液

PBS(0.01 mol/L pH7.4)	1 000 mL
Tween-20	0.5 mL

## 3.1.7 稀释液 含 10% 小牛血清的洗涤液。

## 3.1.8 磷酸盐-柠檬酸缓冲液(pH5.0)

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

## 3.1.9 底物溶液

磷酸盐-柠檬酸缓冲液(pH5.0)	10 mL
邻苯二胺(OPD)	4 mg
30%过氧化氢	2 $\mu\text{L}$

## 3.1.10 终止液(2 mol/L 硫酸)

硫酸	58 mL
蒸馏水	442 mL

## 3.2 器材

## 3.2.1 酶标仪。

3.2.2 聚苯乙烯板:40孔、55孔或96孔(可拆或不可拆),用前洗净晾干,在紫外线下20 cm处照射1 h。

3.2.3 微量加样器:容量5~50  $\mu\text{L}$ 、50~200  $\mu\text{L}$ 。

3.2.4 37℃培养箱。

## 4 操作步骤

## 4.1 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100  $\mu\text{L}$ ,置37℃1 h后再4℃过夜。

4.2 用洗涤液洗5次,每次3 min,叩干。

## 4.3 加样

待检血清和阴性、阳性对照血清分别用稀释液做1:40稀释,分别加入两孔(特异性抗原孔和正常抗原孔),每孔100  $\mu\text{L}$ ,37℃1 h,洗涤同上。

## 4.4 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100  $\mu\text{L}$ ,37℃1 h,洗涤同上。

## 4.5 加底物溶液

每孔加入新配制的底物溶液100  $\mu\text{L}$ ,置37℃,避光显色10~15 min。

## 4.6 终止反应

每孔加入终止液50  $\mu\text{L}$ 。

## 4.7 测A值

在酶标仪上,于490 nm处读出各孔A值。

## 5 结果判定

在阴性和阳性对照血清成立的条件下,进行结果判定。

5.1 同时符合下列3个条件者,判为阳性。

5.1.1 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;

5.1.2 待检血清与特异性抗原反应的  $A$  值  $\geq 0.2$ ;

5.1.3 待检血清与特异性抗原反应的  $A$  值/阴性对照血清与特异性抗原反应的  $A$  值  $\geq 2.1$ 。

5.2 均不符合上述3个条件者,判为阴性。

5.3 仅有1~2条符合者,判为可疑。需选用同一种方法或另一种方法重试。

表1 ELISA 抗原的制备

病毒	细胞、鸡胚	收获时间, d	细胞病变
HV	E6	10~14	—
LCMV	Vero	7~10	+++~++++
Ect.	BHK21, Vero	2~3	++~+++
MHV	DBT, L929	2~4	+++~++++
Sendai	鸡胚	3	+++~++++
Reo3	BSC-1, BHK21	4~5	++++
PVM	BHK21	10~14	++~+++
TMEV	BHK21	5~6	++++
MVM	ME, 3T3	7~10	++++
MAc	MK, ME, 3T3	3~5	++++
Polyoma	ME, 3T3	10~14	+++~++++
KRV	RE	7~12	+++~++++
H-1	RE	7~12	+++~++++
RCV/SDAV	DBT, L929	2~3	+++~++++
RRV	MA-104	2~3	+++~++++
RV	BHK21	6~7	+++~++++
CPV	FK81	3~5	+++~++++
ICHV	MDCK	3~4	+++~++++
CDV	Vero	8~10	+++~++++
B Virus	Vero	1~2	+++~++++
SRV	Raji	10~14	细胞融合
SIV	CM-174	10~14	细胞融合
SPV	BHK21	2~3	++~+++

注: MK-小鼠肾细胞; ME-小鼠胚细胞; RE-大鼠胚细胞。

## 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。

# 中华人民共和国国家标准

## 实验动物 免疫酶试验

GB/T 14926.51—2001

Laboratory animal—Immunoenzyme assay (IEA)

### 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)

3,3-二胺基联苯胺盐酸盐(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 $\mu\text{L}$ 。

### 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。				

## 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。

# 中华人民共和国国家标准

## 实验动物 免疫荧光试验

GB/T 14926.52—2001

Laboratory animal—Immunofluorescence assay (IFA)

### 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、阳性对照血清成立的条件下,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。				

## 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—Haemoglutination 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联,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	收获(d)	病变(+)	抗原处理	滴度(HA)	备注
KRV	RE	2~3	2~3	冻融2~3次,2 000 r/min	64~128	
H-1	RE	2~3	2~3	离心10~20 min,取上清	128	
CPV	FK81	3~4	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

### 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 微量震荡器。

### 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 $\mu\text{L}$ )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  $\mu\text{L}$  于微量血凝板孔内。

4.2 每孔内再加 25  $\mu\text{L}$  PBS 与 50  $\mu\text{L}$  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。



## 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》中的血凝抑制试验方法,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

本标准规定了血凝抑制试验(HAI)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

某些病毒在一定的条件下,能够选择性的凝集某些动物红细胞。这种凝集红细胞的能力可被特异性抗体所抑制。

## 3 主要试剂与器材

### 3.1 试剂

#### 3.1.1 血凝素抗原

血凝抗原除部分病毒(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联,凡培养于鸡胚或细胞培养中的病毒及其抗原物质,经离心除去沉淀,均可用作血凝抑制试验的血凝素抗原。见 GB/T 14926.52—2001 中表 1、表 2。

#### 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 pH7.4 PBS 洗三次,再悬于 PBS 中。

#### 3.1.3 阳性血清

#### 3.1.4 阴性血清

#### 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 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℃, 30 min 灭菌,保存于 4℃。

### 3.2 器材

- 3.2.1 恒温培养箱。
- 3.2.2 微量震荡器。
- 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  $\mu\text{L}$ )或微量稀释棒。

#### 4 操作步骤

##### 4.1 血凝素滴定

将血凝素用PBS做连续倍比稀释,每稀释度留25  $\mu\text{L}$ 于微量血凝板孔内,再加25  $\mu\text{L}$  PBS和50  $\mu\text{L}$  红细胞悬液,摇匀。同时设立红细胞对照。置所需温度30~60 min,判定结果时将出现凝集“++”的最高稀释度定为血凝素的效价。

##### 4.2 待检血清处理

将被检血清置56℃水浴30 min。有的血清含有非特异性抑制素,可用霍乱滤液处理,即1份血清加4份滤液,混匀后置37℃水浴过夜,再置56℃水浴30 min。有的血清含有非特异性凝集素,可按血清体积1/10量加入50%红细胞悬液置4℃16 h或室温2 h,然后离心除去血球。

##### 4.3 血清稀释

在微量血凝反应板(U型或V型)上,自1:10起作一系列倍比稀释,每稀释度留25  $\mu\text{L}$ 于血凝板孔内,另取1:10稀释的血清25  $\mu\text{L}$ ,作血清对照(见表1)。

##### 4.4 滴加血凝素

在已稀释好的血清孔内(除血清对照孔外)加25  $\mu\text{L}$ 血凝素(根据血凝素不同,稀释成4U或8U)。血清对照孔加25  $\mu\text{L}$  PBS。摇均后置所需温度作用30 min(见表3)。

##### 4.5 血凝素单位校正

滴加血凝素的同时,将8U血凝素稀释成4U、2U、1U和1/2U,每孔25  $\mu\text{L}$ ,摇匀后置所需温度作用一定时间(见表2)。

##### 4.6 红细胞对照 加PBS 50 $\mu\text{L}$ (见表2)

##### 4.7 血清对照(见表3)。

4.8 滴加红细胞悬液。全部试验和对照孔内,均加50  $\mu\text{L}$ 红细胞悬液,摇匀后置所需温度作用一定的时间(见表3),判定结果。

#### 5 结果判定

在对照系统(阴性血清、阳性血清、待检血清、抗原和红细胞)成立的条件下判定结果。

判定时以完全不出现血凝的血清最高稀释度为血清的血凝抑制滴度。

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。

表 1 血球凝集抑制试验(检测系统)操作方法

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
稀释度	1/10	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1 280	1/2 560	1/512	红细胞 对照
待检血清, $\mu\text{L}$	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	
血凝素, $\mu\text{L}$		25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	
在所需温度条件下作用一定时间												
PBS, $\mu\text{L}$	25											50
红细胞, $\mu\text{L}$	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

表 2 血球凝集抑制试验(对照系统)操作方法

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
血凝素单位	4	2	1	1/2								
PBS, $\mu\text{L}$	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
血凝素, $\mu\text{L}$	25	25	25	25								
阳性血清, $\mu\text{L}$					25	25	25	25				
阴性血清, $\mu\text{L}$									25	25	25	25
红细胞, $\mu\text{L}$	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

表 3 血凝抑制试验条件

病毒	血凝单位	红细胞	抗原抗体作用		加红细胞后 作用温度, $^{\circ}\text{C}$	判定阳 性滴度	备注
			时间, min	温度, $^{\circ}\text{C}$			
TMEV	8	人“0”	60	22	22	20	
Sendai	4	鸡、豚鼠	30	22	22	10	
KRV	8	豚鼠	30	22	22	20	
H-1	8	豚鼠	30	22	22	20	
RHDV	8	人“0”	30	22	22	10	疫苗保护效果滴度(HAI)
CPV	8	猪	30	22 或 37	4	80	疫苗保护效果滴度(HAI)
ICHV	4	人“0”	30	37	37	160	疫苗保护效果滴度(ELISA)
RV	4	鹅	120	22	4	160	疫苗保护效果滴度(ELISA)

## 前 言

本标准规定了免疫酶组织化学法所用试剂、器材和操作步骤等。

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 免疫酶组织化学法

GB/T 14926.55—2001

Laboratory animal—Immunohistochemistry (IH)

### 1 范围

本标准规定了免疫酶组织化学法(IH)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

用已知的特异性抗体与标本中待测抗原反应,如待测抗原是特异性抗体的相应抗原则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 抗病毒单克隆抗体或抗血清。

3.1.2 羊或兔抗小鼠、大鼠、地鼠、豚鼠、兔、犬、猴 IgG 抗体标记辣根过氧化物酶。

3.1.3 PBS (0.01 mol/L, pH7.6)

氯化钠	8.5 g
磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.20 g
磷酸二氢钾( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	3.12 g
蒸馏水	加至 1 000 mL

#### 3.1.4 底物溶液

3,3'-二氨基联苯胺盐酸盐(DAB)	40 mg
PBS	100 mL
丙酮	5 mL
3%过氧化氢	0.1 mL

#### 3.2 器材

3.2.1 石蜡切片机或冰冻切片机。

3.2.2 载玻片及盖玻片。

3.2.3 普通显微镜。

### 4 操作步骤

4.1 冰冻切片风干后用丙酮固定 10~15 min,石蜡切片,常规脱蜡至 PBS(切片应用白胶或铬矾明胶做粘合剂,以防脱片)。

#### 4.2 去内源酶

用 0.3%过氧化氢甲醇溶液或 1%盐酸酒精 37℃作用 30 min。

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

4.3 胰蛋白酶消化

必要时用胰蛋白酶消化处理,以便充分暴露抗原。

4.4 漂洗

PBS 洗 3 次,每次 5 min。

4.5 封闭

5%小牛血清或 1:10 稀释的正常马血清,37℃湿盒中作用 30 min。

4.6 加适当稀释的已知单抗或抗血清,37℃湿盒中作用 1 h 或 30 min 后 4℃过夜。

4.7 漂洗同 4.4。

4.8 加适当稀释的第二抗体酶结合物,37℃湿盒作用 1 h。

4.9 漂洗同 4.4。

4.10 底物显色

新鲜配制的 DAB 溶液显色 5~10 min 后漂洗。

4.11 衬染

苏木素或甲基绿衬染细胞核或细胞质。

4.12 常规脱水、透明、封片、显微镜观察。

5 结果判定

对照片本底清晰,背景无非特异着染,被检物呈黄至棕褐色着染,即可判为阳性。

---