



中华人民共和国国家标准

GB/T 19180—2020
代替 GB/T 19180—2003

牛海绵状脑病诊断技术

Diagnostic techniques for bovine spongiform encephalopathy

2020-12-14 发布

2020-12-14 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 GB/T 19180—2003《牛海绵状脑病诊断技术》。本标准与 GB/T 19180—2003 相比,除编辑性修改外,主要技术变化如下:

- 增补了 H·E 组织病理染色法、免疫组织化学方法和免疫印迹方法的适用范围,删除了“也可用于其他动物的传染性海绵状脑病的诊断”(见第 1 章);
- 优化了临床症状的描述(见 4.3);
- 优化了 H·E 组织病理染色法操作步骤(见 5.1)和免疫组织化学方法操作步骤(见 5.2);
- 增补了免疫印迹方法(见 5.3)。

本标准由中华人民共和国农业农村部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:中国动物卫生与流行病学中心。

本标准主要起草人:王志亮、刘雨田、孙成友、迟田英、宋芳芳、邹艳丽、于小静、吴晓东、王树双。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- GB/T 19180—2003。

引 言

牛海绵状脑病(Bovine Spongiform Encephalopathy, BSE)是由朊病毒引起的牛的一种慢性致死性神经性疾病,对动物和人构成较大危害。世界动物卫生组织(OIE)将其列为严重影响国际贸易的动物疫病之一,我国将其归为一类动物疫病。我国现行《牛海绵状脑病诊断技术》(GB/T 19180—2003)系2003年6月4日由原国家质量监督检验检疫总局发布,2003年12月1日起实施。该标准仅包括临床症状、组织病理学、免疫组织化学等三种诊断方法,未包括OIE陆生动物手册指定的另一种确诊方法即免疫印迹。免疫印迹方法比免疫组织化学方法更灵敏,特异性更好。因此,免疫印迹方法是牛海绵状脑病诊断技术中一种更好的确诊方法,它能更好地服务于我国疯牛病的监测工作。

BSE分为典型BSE和非典型BSE。典型BSE是由于牛采食污染牛羊朊病毒的肉骨粉或者饲料而引起,非典型BSE为自然发生的一种散发性BSE。自然条件下,BSE经由消化道传播,未发现水平和垂直传播的证据。典型BSE的潜伏期一般为2年~8年,平均为4年~5年,多发于4~6岁的牛,2岁以下罕见,6岁以上明显减少。根据病原的分子量大小,非典型BSE又分为H型和L型。非典型BSE的平均发病年龄为11岁。BSE病程多为数月至一年,最终死亡。

大多数BSE病牛无典型临床症状,因此BSE的诊断应通过实验室检测来实现。BSE的病原是动物机体内朊蛋白的异构体,在病牛血清里检测不到BSE朊病毒抗体,所以血清学检测方法对于BSE来说是无意义的。目前,实验室诊断方法多以检测BSE病原为目的,包括免疫组织化学方法、免疫印迹方法、ELISA方法等,其中免疫组织化学方法和免疫印迹方法是OIE手册规定的BSE确诊方法。BSE病牛的中枢神经被朊病毒侵害会出现海绵状空泡变性,在中枢神经保存良好且未发生自溶的情况下,应用H·E组织病理染色法可以观察到这些病变情况。OIE手册规定H·E组织病理染色法是确诊BSE的辅助方法,在使用免疫组织化学方法诊断BSE时应同时使用H·E组织病理染色法予以辅助确诊;在使用免疫印迹方法诊断BSE时,如果样品适合进行H·E组织病理染色,那么也应同时使用H·E组织病理染色法予以辅助确诊。

牛海绵状脑病诊断技术

1 范围

本标准规定了 BSE 诊断的临床诊断、实验室诊断及综合判定技术要求。

本标准适用于 BSE 的诊断,其中临床诊断适用于 BSE 的监测和流行病学调查,H·E 组织病理染色法适用于 BSE 中枢神经系统的病理诊断,免疫组织化学方法和免疫印迹方法适用于 BSE 的病原学诊断。



2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BSE:牛海绵状脑病(Bovine Spongiform Encephalopathy)

H·E:苏木精伊红(Hematoxylin and eosin)

HRP:辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase)

PBS:磷酸盐缓冲溶液(Phosphate buffered solution)

PK 酶:蛋白酶 K(Proteinase K)

PVDF:聚偏氟乙烯(Polyvinylidene fluoride)

SDS:十二烷基硫酸钠(Sodium dodecyl sulfate)

TBST:等渗缓冲盐溶液(Tris-HCl buffered solution with Tween)

3 临床诊断

3.1 易感动物

牛科和猫科动物,包括各种牛、各种羊和各种猫科动物。

3.2 临床症状

3.2.1 行为异常

表现为不安、恐惧、异常震惊或沉郁;不自主运动,如磨牙、震颤;不愿经过有缝隙的地面或进入畜栏等。

3.2.2 感觉或反应过敏

表现为视、听、触三觉过于敏感。对光线的明暗变化、外部声响以及颈部触摸过度敏感,这是 BSE 病牛的特征性临床表现。

3.2.3 运动异常

病牛步态呈“鹅步”状,共济失调,四肢伸展过度,有时倒地,难以站立。

3.2.4 体重和体况下降

病牛的体重和体况下降,表现出异常消瘦,体质虚弱。

3.3 病理变化

剖检无明显病变。

3.4 结果判定

易感动物出现上述临床症状,又不能确定为其他疾病时,可判定为疑似 BSE。

确诊应采集易感动物的脑组织进行实验室诊断。

4 实验室诊断

4.1 H·E 组织病理染色法

4.1.1 实验室生物安全要求

实验操作应在生物安全Ⅱ级以上的实验室进行。涉及有毒挥发性试剂的操作应在通风橱中进行,如甲醛、甲酸、二甲苯、氯仿等。

4.1.2 仪器设备

显微镜、切片机、电锯/钢锯、骨钳、眼科剪、直形镊(长约 25 cm)、手术刀、切片刀、烘烤箱、脱水筐、染色缸、包埋模具、载玻片、盖玻片、玻璃棒、染色架、量筒(量程分别为 100 mL、1 000 mL、5 000 mL)、通风橱。

4.1.3 试剂

4.1.3.1 蒸馏水。

4.1.3.2 10%中性福尔马林固定液(见附录 A 中 A.1)。

4.1.3.3 无水乙醇。

4.1.3.4 二甲苯。

4.1.3.5 氯仿。

4.1.3.6 软蜡(熔点 56 ℃)。

4.1.3.7 硬蜡(熔点 60 ℃)。

4.1.3.8 苏木素染液(H·E 染液,见 A.2)。

4.1.3.9 1%盐酸酒精(见 A.3)。

4.1.3.10 饱和碳酸锂水溶液(见 A.4)。

4.1.3.11 95%酒精伊红溶液(见 A.5)。

4.1.3.12 中性树胶。

4.1.3.13 无机试剂原料均为分析纯。

4.1.4 采样

将牛头固定,用电锯从前额两牛角根部向枕骨大孔背侧缘方向锯开,使脑部暴露。剪开脑膜并切断所有与脑部相连的神经和血管,取出整脑,包括大脑、小脑和完整脑干。大规模监测采样时,可用专用采样勺(国家牛海绵状脑病参考实验室提供)从枕骨大孔处取出延脑部组织即可。采样勺取样时,先上下左右四个方向剪开脑硬膜,再用戴一次性乳胶手套的手指绕延脑转一转以切断脑神经和血管,然后紧贴颅腔壁插入采样勺,插入深度约 5 cm~7 cm。用力将采样勺的手柄往上翘,再往下切断脑组织,然后左右切断脑组织,最后将切下的脑组织往外抠出。

4.1.5 固定

将所有组织直接放入 10 倍体积的 10% 中性福尔马林固定液中渗透固定 96 h, 换新配制的固定液再固定 48 h。

4.1.6 组织切片制作

4.1.6.1 取材

把大脑、小脑、脑干组织分离开, 分别横切成 3 mm~5 mm 厚的组织块, 选取以下部位组织做进一步处理, 包括大脑、小脑、脑桥、丘脑、四叠体、脑干、延髓。适当修剪这七块用于检测的组织边角以适用脱水筐大小, 剩余组织继续固定以备用。用脱水筐装好检测用的组织块, 并用铅笔做好标记, 盖好脱水筐盖。投入新配制的 10 倍体积的固定液再固定 72 h。

4.1.6.2 甲酸处理

将装有组织块的脱水筐移入 98% 甲酸中作用 1 h, 自来水冲洗 20 min, 然后再移入新配制固定液中处理 3 h。

4.1.6.3 脱甲醛

将装有组织块的脱水筐放入染色缸中, 用缓慢流动的自来水漂洗 24 h。

4.1.6.4 脱水

将装有组织块的脱水筐放入染色缸中, 依次在以下梯度酒精中分别脱水:

- a) 75% 酒精浸泡 2 h。
- b) 85% 酒精浸泡 2 h。
- c) 95% 酒精 I 浸泡 2 h。
- d) 95% 酒精 II 浸泡 2 h。
- e) 100% 酒精 I 浸泡 2 h。
- f) 100% 酒精 II 浸泡 2 h。

4.1.6.5 透明

4.1.6.5.1 氯仿 I 浸泡 2.5 h 或者二甲苯 I 浸泡 40 min。

4.1.6.5.2 氯仿 II 浸泡 3 h 或者二甲苯 II 浸泡 30 min。

4.1.6.6 浸蜡

依次在以下石蜡中浸蜡, 温度为 60 ℃:

- a) 软蜡 I 浸泡 40 min。
- b) 软蜡 II 浸泡 1 h。
- c) 硬蜡浸泡 1 h。

4.1.6.7 包埋

4.1.6.7.1 若包埋模具为金属条结构的, 则先组装好包埋模具, 放置在光滑平整的金属台面上, 再将熔化的新硬蜡倒入包埋模具里, 直至倒满, 然后将浸好蜡的组织块放入其中(待切片的一面朝下, 并放平整)。如果一个模具里可以放置多个组织, 则两个组织之间距离应大于 1.5 cm。冷却过夜, 用切片刀修

切成形,获得平整的石蜡组织块,然后给每个组织块贴上标签。

4.1.6.7.2 如果包埋模具为凹型的用于单个组织包埋的模具(常见包埋机所用模具),则先将模具加热至 70℃,放置在同样温度的金属台面上,然后滴滴熔化的新硬蜡,再将浸好蜡的组织块放入其中(待切片的一面朝下,并放平整),用去除盖子的脱水筐(尺寸与包埋模具匹配)放于其上,最后将整个包埋模具(包括组织等)平移至冷台上。待冷却好后,将脱水筐从包埋模具中取出,获得平整的石蜡组织块,然后给每个组织块贴上标签。

4.1.6.8 切片

将石蜡组织块切成 5 μm 厚的组织薄片。每块组织连续切片 3 片~10 片,切片刀、碎屑和废弃组织应焚烧处理。组织薄片用干净的粘附剂预处理过的载玻片贴片(组织应贴在磨砂面/标记面的同侧,以便给玻片做标记),然后用铅笔在载玻片上做好标记。

4.1.6.9 烤片

贴好组织薄片的载玻片先在自然条件下晾干,然后放入烘烤箱中 50℃烘烤 4 h 以上。

4.1.7 组织染色

4.1.7.1 脱蜡和脱二甲苯

取烘烤好的玻片整齐放入染色架上,依次在以下试剂中脱蜡和脱二甲苯:

- a) 二甲苯 I 10 min。
- b) 二甲苯 II 10 min。
- c) 100%酒精 I 2 min。
- d) 100%酒精 II 2 min。
- e) 95%酒精 I 2 min。
- f) 95%酒精 II 2 min。
- g) 85%酒精 2 min。
- h) 75%酒精 2 min。
- i) 自来水洗 2 min。

4.1.7.2 H·E 染色

- 4.1.7.2.1 苏木素染液 15 min。
- 4.1.7.2.2 自来水漂洗 2 min。
- 4.1.7.2.3 1%盐酸酒精 10 s。
- 4.1.7.2.4 自来水漂洗 5 min。
- 4.1.7.2.5 饱和碳酸锂水溶液 30 s。
- 4.1.7.2.6 自来水漂洗 10 min。
- 4.1.7.2.7 75%酒精 2 min。
- 4.1.7.2.8 85%酒精 2 min。
- 4.1.7.2.9 95%酒精伊红液 1 min。

4.1.7.3 脱水和透明

- 4.1.7.3.1 95%酒精 2 min。
- 4.1.7.3.2 100%酒精 I 2 min。

4.1.7.3.3 100%酒精Ⅱ 2 min。

4.1.7.3.4 二甲苯Ⅰ 2 min。

4.1.7.3.5 二甲苯Ⅱ 2 min。

4.1.7.4 封片

用干净玻璃棒取一滴中性树胶,滴加在玻片的组织上,再用干净的盖玻片进行封片,放置在平整的台面上使其自然干燥。

4.1.7.5 镜检及判定

4.1.7.5.1 分别在倍数为 10×10 、 10×20 和 10×40 的光学显微镜下观察切片。

4.1.7.5.2 阳性结果。灰质区出现空泡变性,特别是神经纤维网浆和神经细胞内有规则的圆形或卵圆形空泡,空泡内不着色或被伊红淡染,界限明显,胞核被挤压于一侧,甚至消失;有的神经细胞被单个或多个特异性空泡胀大,成为“气球样”空泡性神经细胞。容易出现空泡病变的部位是中脑和延髓的核群,且呈双侧对称性分布。

4.1.7.5.3 阴性结果。灰质区无特征性空泡变性。

4.1.7.5.4 在正常情况下,动眼神经核和红核处的核周质也可能有少量空泡出现,但不呈双侧对称,应注意区别。若在脑干灰质区未发现双侧对称性海绵状空泡病变,则用免疫组织化学方法做进一步诊断。组织病理学诊断只是疯牛病确诊的辅助方法,确诊时应结合免疫组织化学或免疫印迹诊断方法。

4.2 免疫组织化学方法

4.2.1 实验室生物安全要求

见 4.1.1。

4.2.2 仪器设备

见 4.1.2。另外,还需要高压锅(温度能达到 $134\text{ }^{\circ}\text{C}$)、水浴锅、恒温箱、冰箱(含冷冻和冷藏)、电磁炉、金属锅(烧水用)、陶瓷锅(直径不少于 18 cm)、湿盒(在玻片盒的底部铺上湿的吸水纸便成了湿盒)、微量移液器(量程分别为 $0.5\text{ }\mu\text{L}\sim 10\text{ }\mu\text{L}$ 、 $5\text{ }\mu\text{L}\sim 50\text{ }\mu\text{L}$ 、 $10\text{ }\mu\text{L}\sim 100\text{ }\mu\text{L}$ 、 $50\text{ }\mu\text{L}\sim 200\text{ }\mu\text{L}$ 、 $100\text{ }\mu\text{L}\sim 1\text{ }000\text{ }\mu\text{L}$)。

4.2.3 试剂

4.2.3.1 蒸馏水。

4.2.3.2 10%中性福尔马林固定液(见 A.1)。

4.2.3.3 无水乙醇。

4.2.3.4 二甲苯。

4.2.3.5 氯仿。

4.2.3.6 软蜡(熔点 $56\text{ }^{\circ}\text{C}$)。

4.2.3.7 硬蜡(熔点 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$)。

4.2.3.8 蛋白酶 K 缓冲液(见附录 B 中 B.1)。

4.2.3.9 蛋白酶 K 工作液(见 B.2)。

4.2.3.10 高压缓冲液(见 B.3)。

4.2.3.11 3%双氧水-甲醇(见 B.4,如果免疫组织化学显色试剂盒中带有类似的试剂,则使用试剂盒中的试剂)。

4.2.3.12 0.1 mol/L PBS(见 B.5)。

4.2.3.13 5%正常猪血清(见 B.6,如果免疫组织化学显色试剂盒中带有类似的试剂,则使用试剂盒中的试剂,但不得使用反刍动物源性血清)。

4.2.3.14 Mayer 氏苏木素液(商品化产品)。

4.2.3.15 水溶性封片剂(商品化产品)。

4.2.3.16 二步法免疫组织化学显色试剂盒(商品化产品,其中二抗应为抗鼠二抗)。

4.2.3.17 一抗(商品化产品)工作液(见 B.7)。

4.2.3.18 无机试剂原料均为分析纯。

4.2.4 采样

见 4.1.4。

4.2.5 固定

见 4.1.5。

4.2.6 组织切片制作

见 4.1.6。

4.2.7 免疫组织化学操作步骤

4.2.7.1 设置对照。免疫组织化学诊断应设置疯牛病阳性和阴性对照组织切片。

4.2.7.2 脱蜡和脱二甲苯。取烘烤好的玻片和对照切片整齐放入染色架上,依次在以下试剂中脱蜡和脱二甲苯:

- a) 二甲苯 I 10 min。
- b) 二甲苯 II 10 min。
- c) 100%酒精 I 2 min。
- d) 100%酒精 II 2 min。
- e) 95%酒精 I 2 min。
- f) 95%酒精 II 2 min。
- g) 85%酒精 2 min。
- h) 75%酒精 2 min。
- i) 自来水洗 2 min。

4.2.7.3 从自来水中取出装有玻片的染色架,在 PBS 中洗 5 min×3 次。在洗第一次 PBS 的同时,配制适量的蛋白酶 K 缓冲液,并放入水浴锅中预热 37℃。另外,取出冷冻的蛋白酶 K 母液使其化冻,以待用。

4.2.7.4 在最后一次 PBS 漂洗时,配制好蛋白酶 K 工作液。PBS 洗完后,立即将玻片放入装有蛋白酶 K 工作液的染色缸中,并确保玻片全部浸入液体,在 37℃ 水浴中消化处理 15 min。与此同时,准备好煮沸的蒸馏水,并配制好高压缓冲液。

4.2.7.5 将高压缓冲液倒入陶瓷锅,并立即将玻片放入其中,确保玻片完全浸入水中,盖好盒盖,在 121℃ (约 103 kPa) 高压处理 20 min,自然冷却至 60℃ 以下取出。

4.2.7.6 在 PBS 中洗 5 min×3 次,洗最后一遍时配制好 3% 双氧水甲醇溶液。

4.2.7.7 将玻片完全浸入 3% 双氧水甲醇溶液中室温处理 5 min。

4.2.7.8 在 PBS 中洗 5 min×3 次。如果正常猪血清是冷冻的,则需要提前取出化冻,用前 5 min 配制好。

4.2.7.9 在玻片的组织上滴满 5% 正常猪血清,置湿盒中轻轻盖上盖子,室温作用 20 min。同时,取出

冷冻的一抗进行化冻,并配制好工作液。

4.2.7.10 弃去正常猪血清,用吸水纸吸干组织四周的液体。

4.2.7.11 将一抗工作液滴加在组织上,确保组织完全覆盖,湿盒中 37 ℃作用 4 h,或者在 2 ℃~8 ℃下作用过夜。

4.2.7.12 在 PBS 中洗 5 min×3 次,同时取出 2 ℃~8 ℃下保存的免疫组织化学显色试剂盒,使其回温至室温状态。

4.2.7.13 洗完后用吸水纸吸干组织四周的液体,然后在组织上滴满显色试剂盒中的标记聚合物-HRP 的抗鼠二抗,湿盒中室温作用 30 min。

4.2.7.14 在 PBS 中洗 5 min×3 次。

4.2.7.15 洗完后用吸水纸吸干组织四周的液体,然后在组织上滴满试剂盒中的底物显色液,确保组织完全覆盖,湿盒中室温作用 5 min~10 min。

4.2.7.16 在蒸馏水中漂洗 3 min×3 次。

4.2.7.17 将玻片放入 Mayer 氏苏木素液复染作用 1 min。

4.2.7.18 在蒸馏水中漂洗 5 min。

4.2.7.19 用水溶性封片剂封片。

4.2.8 结果判定

4.2.8.1 在阳性和阴性对照片染色结果正确的情况下,分别在倍数为 10×10、10×20 和 10×40 的光学显微镜下观察组织玻片,进行结果判定。

4.2.8.2 阳性结果:脑组织灰质区特别是脑干部的迷走神经背核、孤束核和三叉神经脊束核等处出现特异性颗粒状染色,则判定为疯牛病阳性。

4.2.8.3 阴性结果:脑组织灰质区未见特异性颗粒状染色,则判定为疯牛病阴性。

4.3 免疫印迹方法

4.3.1 实验室生物安全要求

见 4.1.1,但组织匀浆、消化及变性时需在负压罩下操作。

4.3.2 仪器设备

电泳仪、半干转印仪、组织匀浆机、化学发光成像仪、冰箱(含冷冻和冷藏)、温箱(能恒定在 37 ℃)、金属浴、摇床、电子天平、平皿(直径为 12 cm~15 cm)、玻璃棒、眼科剪、眼科镊、保鲜膜、玻璃板(大小约 20 cm×20 cm)、专用铲刀(用于撬开预制胶)、塑料桶、微量移液器(量程分别为 0.5 μL~10 μL、5 μL~50 μL、10 μL~100 μL、50 μL~200 μL、100 μL~1 000 μL)。

4.3.3 试剂

4.3.3.1 蒸馏水。

4.3.3.2 10 道泳道的 12% SDS NuPage 胶(又称预制胶,商品化产品)。

4.3.3.3 预染蛋白质 Marker(商品化产品,应含有 15 kDa~35 kDa 之间的蛋白条带)。

4.3.3.4 匀浆缓冲液(见附录 C 中 C.1)。

4.3.3.5 蛋白酶 K 溶液(见 C.2)。

4.3.3.6 消化阻止液(见 C.3)。

4.3.3.7 上样缓冲液(见 C.4)。

4.3.3.8 电泳缓冲液(商品化产品,与 12% SDS NuPage 匹配)。

- 4.3.3.9 甲醇。
- 4.3.3.10 TBST(见 C.5)。
- 4.3.3.11 转印缓冲液(见 C.6)。
- 4.3.3.12 封闭液(见 C.7)。
- 4.3.3.13 PVDF 膜。
- 4.3.3.14 3MM 滤纸。
- 4.3.3.15 一抗(商品化产品)工作液(见 C.8)。
- 4.3.3.16 标记 HRP 的兔抗鼠 IgG(商品化产品)工作液(见 C.9)。
- 4.3.3.17 化学发光显色试剂盒(商品化产品)。
- 4.3.3.18 阳性对照(见 C.10)。
- 4.3.3.19 阴性对照(见 C.11)。
- 4.3.3.20 无机试剂原料均为分析纯。

4.3.4 采样

通过枕骨大孔采集脑干部组织,并于 $-15\text{ }^{\circ}\text{C}\sim-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存待用。

4.3.5 实验操作步骤

4.3.5.1 样品处理

取 100 mg~130 mg 脑干部组织放入 1.5 mL 的专用匀浆管中,加入 1.2 mL 匀浆缓冲液。用匀浆机以 6 200 r/min 的速度匀浆 45 sec。将匀浆好的样品吸取到 1.5 mL 离心管中,以 7 000 g 离心 5 min,然后将上清移至另一离心管中。

4.3.5.2 PK 酶消化

取 50 μL 离心好的样品、阳性对照、阴性对照分别移至 1.5 mL 离心管中,各加入 5 μL 蛋白酶 K 溶液,使蛋白酶 K 终浓度达到 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上,混匀后放在 48 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴中消化 40 min。为防止消化过程中离心管盖被热气体撑开,可以加一重物如铁块压住盖子。消化完后各加入 3 μL 消化阻止液阻止蛋白水解反应。

4.3.5.3 蛋白变性

在消化完的样品、阳性对照、阴性对照中分别加入 50 μL 上样缓冲液,混匀后置 96 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴中变性 5 min。

4.3.5.4 电泳

4.3.5.4.1 将预制胶安放好,在电泳槽内槽加满电泳缓冲液的工作液(不要溢出),外槽加至浸没过胶底端 1/3 处和电泳槽中的导热丝(总共需要约 400 mL 电泳缓冲液)。如果电泳仪与预制胶不匹配,则可以自行配制 12% SDS Page 胶,配方及操作可参见相关资料。

4.3.5.4.2 两端平行地拔出梳子,在第一道泳道加入 10 μL 蛋白质 Marker,第二道泳道加入 12 μL 阳性对照,第三道泳道加入 12 μL 阴性对照,在其余泳道加入 12 μL 变性完的样品(样品要趁热加)。安装好电泳装置,接通电源,设定电压 200 V、时间 40 min 进行电泳。同时,配制好转印缓冲液,放 2 $^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷。

4.3.5.5 电转印

4.3.5.5.1 电泳完后,取出预制胶。用专用铲刀从四周撬开预制胶外壳,切掉胶的加样齿孔及胶底部染

液线以下部分。在胶上倒一点转印缓冲液,使胶保持湿润。然后按照胶的大小,剪好 PVDF 膜及 4 张滤纸,PVDF 膜应比滤纸稍大。将 PVDF 膜放入 100% 甲醇中浸湿 1 min,之后将滤纸和膜放入转印缓冲液中浸泡平衡 15 min。

4.3.5.5.2 在玻璃板上先放置两层对齐的滤纸,用玻璃棒沿一个方向轻赶气泡,用铲刀将胶取出放于滤纸上,并与滤纸对齐。夹取另两张滤纸,滴一些转印液在胶上,并使胶全部浸湿,然后将浸好的膜从一端慢慢往另一端放下,直至完全覆盖在胶上。如果发现膜与胶之间有白点,说明它们之间存在气泡,则用玻璃棒滚动将其驱赶。如果气泡太多,则取下膜,在转印液中再次浸湿,重新放置于胶上。如此反复,直至没有气泡。然后,将取出另两层滤纸整齐放于膜上,用玻璃棒驱赶气泡。“三明治”做好后,用铲刀将其转入转印槽中,注意膜的一端朝向正极。往“三明治”上倒入少量转印缓冲液,再用玻璃棒轻赶气泡。

4.3.5.5.3 盖上盖子,接通电源,设定电压 15 V、时间 15 min 进行转印。

4.3.5.6 封闭

转印结束后,弃去胶和滤纸。观察 Marker 转印效率,如果膜上有清晰的 Marker 条带,说明转印效率良好,否则转印失败。将膜放入装有封闭液的平皿中,确保膜完全(至少有蛋白的区域)浸没,4℃作用过夜或者 37℃作用 1 h。注意与胶接触的一面朝上,以后的步骤都是这样。封闭结束,置摇床上用 TBST 摇洗 3 次,每次 5 min。

4.3.5.7 一抗作用

将膜放入一抗工作液中,确保膜完全浸没,室温下置摇床摇振孵育 1.5 h。作用完后,置摇床上用 TBST 摇洗 6 次,每次 5 min。

4.3.5.8 二抗作用

将膜放入标记 HRP 的兔抗鼠 IgG 工作液中,确保膜完全浸没,室温下置摇床摇振孵育 1 h。孵育 40 min 后,打开化学发光成像仪进行预热。孵育完后,置摇床上用 TBST 摇洗 6 次,每次 5 min。

4.3.5.9 底物作用

按照化学发光显色试剂盒说明书配制好化学发光底物溶液(至少 5 mL),混合均匀。将膜放置在一干净平皿中,将底物溶液滴加到膜的表面上,作用 10 min。

4.3.5.10 化学发光

按照 5 倍于膜的大小剪一块保鲜膜,并将其展平放于桌上。底物作用完后,将膜取出。再将膜平放在保鲜膜中间位置,拿起保鲜膜的一边,沿 PVDF 膜的一边折起,覆盖在 PVDF 膜上,再将周边的保鲜膜稍微折叠,即可放入化学发光成像仪中或通过 X 光胶片曝光。一般情况曝光 2 min~3 min 即可。若条带太浅,则需要增加曝光时间;相反,则应减少曝光时间,直至效果最佳。注意,每次都要以图片格式保存好照片,以便判定结果。

4.3.6 结果判定

4.3.6.1 在阳性对照和阴性对照均成立的条件下,才可判定其余样品的结果。

4.3.6.2 阳性结果:曝光照片上的样品泳道出现三条特异性黑色条带,且对比胶上的蛋白质 Marker 分析条带大小在 17 ku~33 ku 之间,则判定为疯牛病阳性。

4.3.6.3 阴性结果:曝光照片上的样品泳道没有特异性黑色条带,或者有个别杂条带,但对比胶上的蛋白质 Marker 分析条带大小不在 17 ku~33 ku 之间,则判定为疯牛病阴性。

5 综合判定

5.1 临床无明显特征性症状或判定为疑似的易感动物,经 4.2(免疫组织化学方法)或者 4.3(免疫印迹方法)检测出牛海绵状脑病病原,则可判定为感染牛海绵状脑病。

5.2 免疫组织化学方法诊断 BSE 时应同时使用 H·E 组织病理染色法予以辅助确诊。

5.3 免疫印迹方法诊断 BSE 时,如果样品适合进行 H·E 组织病理染色,那么也应同时使用 H·E 组织病理染色法予以辅助确诊。



附 录 A
(规范性附录)

H·E 组织病理染色法试剂配制

A.1 10%中性福尔马林固定液

A.1.1 配方

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	900 mL
甲醛	100 mL

A.1.2 配法

把以上材料混匀溶解即可使用。

A.2 苏木素染色液

A.2.1 配方

苏木精	1.0 g
无水乙醇	10 mL
蒸馏水	200 mL
氧化汞	0.5 g
冰乙酸	8 mL
钾明矾	20.0 g

A.2.2 配法

先将苏木精溶于无水乙醇,然后将钾明矾和蒸馏水煮沸溶化,去火并迅速加入苏木精无水乙醇溶液中,立即加入氧化汞并煮沸,迅速冷却后加入冰乙酸,过滤后使用。

A.3 1%盐酸酒精

在 100 mL 的 70%或 80%酒精中加入 1 mL 的浓盐酸。

A.4 饱和碳酸锂水溶液

碳酸锂 2 g 加 100 mL 蒸馏水,充分溶解。

A.5 95%酒精伊红溶液

伊红 0.5 g 加入 100 mL 95%酒精中溶解。

附 录 B
(规范性附录)
免疫组织化学方法试剂配制

B.1 蛋白酶 K 缓冲液

盐酸三羟甲基氨基甲烷 (1 mol/L, pH 8.0)	2.5 mL
氯化钙 (0.1 mol/L)	0.75 mL
加蒸馏水至	50 mL

B.2 蛋白酶 K 工作液

使用前在蛋白酶 K 缓冲液中加入 17 μ L 蛋白酶 K 母液(蒸馏水配制,浓度为 14.7 mg/mL),使其工作浓度达 5 μ g/mL。

**B.3 高压缓冲液**

0.1 mol/L 柠檬酸钠	123 mL
0.1 mol/L 柠檬酸	27 mL
煮沸的蒸馏水	1 350 mL

配制时,先将蒸馏水煮沸,然后加入 0.1 mol/L 柠檬酸钠和 0.1 mol/L 柠檬酸混匀即可。

B.4 3%双氧水—甲醇(使用前 5 min 配制)

甲醇	50 mL
双氧水(30%)	1.5 mL

B.5 0.1 mol/L PBS(pH 7.4)

氯化钠	8 g
氯化钾	0.2 g
磷酸氢二钠	1.44 g
磷酸二氢钾	0.24 g

加水 800 mL 溶解,用浓盐酸调 pH 值到 7.4,加水至 1 L。

B.6 5%正常猪血清

0.1 mol/L PBS(pH 7.4)	4 mL
正常猪血清	200 μ L

B.7 一抗工作液

一抗为商品化的鼠抗牛胚蛋白单克隆抗体,用 0.1 mol/L PBS(pH 7.4)稀释单抗,使其工作浓度达到 5 μ g/mL。

附 录 C
(规范性附录)
免疫印迹方法试剂配制

C.1 匀浆缓冲液

盐酸三羟甲基氨基甲烷(pH 7.5)	100 mL
氯化钠	0.88 g
Triton X-100	0.5 mL
脱氧胆酸钠	0.5 g
乙二胺四乙酸	0.29 g
充分溶解混匀即可使用,溶解不充分时可加热。可在 4 ℃下保存数周。	

C.2 蛋白酶 K 溶液

盐酸三羟甲基氨基甲烷(pH 8.0)	10 mL
氯化钙	11.1 mg
蛋白酶 K	6 mg

C.3 消化阻止液

174 mg 苯甲基磺酰氟,溶于 10 mL 异丙醇,使其浓度为 100 mmol/L。使用时的工作浓度约为 5 mmol/L。配好后应分装保存在-20 ℃。

或者用市场上其他的 PK 酶阻止液,按照说明书配制使用即可。

C.4 5×上样缓冲液



10 mL 的配方:	
1 mol/L 盐酸三羟甲基氨基甲烷(pH 6.8)	0.6 mL
50%甘油	5 mL
10% SDS	2 mL
2-巯基乙醇	0.5 mL
1%溴酚蓝	1 mL
蒸馏水	0.9 mL

使用时取 1 份 5×上样缓冲液,加蒸馏水 4 份,并充分混匀。可在 4 ℃下保存数周。

C.5 TBST

氯化钠	8 g
氯化钾	0.2 g
三羟甲基氨基甲烷	3 g

加蒸馏水至 800 mL 溶解,加浓盐酸调 pH 值至 7.4(大约需要 1.9 mL 浓盐酸),后加蒸馏水定容至 1 000 mL,最后加入 500 μ L Tween-20。

C.6 转印缓冲液

三羟甲基氨基甲烷	3.028 g
甘氨酸	14.413 g

加蒸馏水溶解至 900 mL,再加 100 mL 100% 甲醇,用前放置 2 $^{\circ}$ C ~ 8 $^{\circ}$ C 预冷。

C.7 封闭液

牛血清白蛋白	2 g
TBST	100 mL

充分溶解即可使用。

C.8 一抗工作液

一抗为商品化的鼠抗牛朊蛋白单克隆抗体(也能与痒病病原结合),用含 1% 牛血清白蛋白的 TBST 溶液稀释单抗,使其工作浓度达到 5 μ g/mL。

C.9 标记 HRP 的兔抗鼠 IgG 工作液

用含 1% 牛血清白蛋白的 TBST 溶液稀释抗体,使其工作浓度达到 5 μ g/mL。

C.10 阳性对照

取免疫组化方法验证为痒病阳性的脑干部组织 100 mg,按照 4.3.5.1 的要求进行匀浆、离心处理,并以每管 50 μ L 分装于 1.5 mL 离心管中, -20 $^{\circ}$ C 冷冻保存待用。制作过程中的生物安全要求见 4.3.1 规定。

C.11 阴性对照

取免疫组化方法验证为痒病阴性的脑干部组织 100 mg,按照 4.3.5.1 的要求进行匀浆、离心处理,并以每管 50 μ L 分装于 1.5 mL 离心管中, -20 $^{\circ}$ C 冷冻保存待用。

参 考 文 献

- [1] 世界动物卫生组织.陆生动物诊断试验和疫苗手册.
 - [2] 英国 OIE 疯牛病参考实验室 BSE 诊断手册
-

