



中华人民共和国国家标准

GB/T 18644—2020
代替 GB/T 18644—2002

猪囊尾蚴病诊断技术

Diagnostic techniques for porcine cysticercosis

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

目 次

前言 III

引言 IV

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 缩略语 1

4 显微镜检查 1

 4.1 试剂 1

 4.2 仪器设备 1

 4.3 虫体采集 2

 4.4 压片制备 2

 4.5 显微镜检查 2

 4.6 显微镜检查结果判定 2

5 PCR 法 2

 5.1 试剂 2

 5.2 仪器设备 2

 5.3 引物 3

 5.4 样品 3

 5.5 PCR 操作程序 3

 5.6 扩增产物电泳检测 4

 5.7 试验成立条件 4

 5.8 PCR 结果判定 4

6 间接 ELISA 4

 6.1 试剂 4

 6.2 仪器设备 4

 6.3 样品 5

 6.4 试验步骤 5

 6.5 试验成立条件 6

 6.6 ELISA 结果判定 6

7 Dot-ABC-ELISA 6

 7.1 试剂 6

 7.2 仪器设备 7

 7.3 样品 7

 7.4 试验步骤 7

 7.5 试验成立条件 8

 7.6 Dot-ABC-ELISA 结果判定 8

8 综合判定 8

附录 A (规范性附录) 生理盐水及猪囊尾蚴头节形态特征 9

附录 B (规范性附录) PCR 引物位置、溶液配制及电泳结果 10

附录 C (规范性附录) ELISA 试剂及其配制 12

附录 D (资料性附录) 猪囊尾蚴 TS-CC18 重组蛋白的制备 14

附录 E (资料性附录) 间接酶联免疫吸附试验的加样 16

附录 F (资料性附录) 猪囊尾蚴 TS-CC18 和烯醇化酶单克隆抗体的制备 17

附录 G (资料性附录) Dot-ABC-ELISA 相关试剂配制及结果判定 20



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 18644—2002《猪囊尾蚴病诊断技术》，与 GB/T 18644—2002 相比，除编辑性修改外，主要技术变化如下：

- 范围部分增加了 PCR 和 Dot-ABC-ELISA 技术(见第 1 章)；
- 增加了缩略语部分(见第 3 章)；
- 增加了病原的 PCR 检测方法(见第 5 章)；
- 修改了酶联免疫吸附试验的检测抗原和检测步骤，直接对血清样品进行抗体检测(见第 6 章，2002 年版的第 3 章)；
- 增加了检测循环抗原的 Dot-ABC-ELISA 方法(见第 7 章)；
- 增加了综合判定(见第 8 章)；
- 增加了生理盐水及猪囊尾蚴头节图片(见附录 A)，PCR 引物位置、溶液配制及电泳图片(见附录 B)，ELISA 试剂及其配制(见附录 C，2002 年版的附录 A)，猪囊尾蚴 TS-CC18 重组蛋白的制备(见附录 D)，间接酶联免疫吸附试验加样示例(见附录 E)，猪囊尾蚴 TS-CC18 和烯醇化酶单克隆抗体的制备(见附录 F)，Dot-ABC-ELISA 相关试剂配制及结果判定(见附录 G)。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

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：中国农业科学院兰州兽医研究所。

本标准主要起草人：才学鹏、骆学农、张少华、郑亚东、郭爱疆、侯俊玲。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

- GB/T 18644—2002。



引 言

猪囊尾蚴病(porcine cysticercosis)是由猪带绦虫(*Taenia solium*)的幼虫所引起的一种危害严重的人兽共患寄生虫病。世界动物卫生组织将该病列为需申报的疾病之一。目前,该病广泛存在于发展中国家,而且发达国家的病例也有逐年增加的趋势,不仅影响养猪业的发展,造成巨大的经济损失,而且还严重威胁人类健康。

猪囊尾蚴病的诊断包括病原学诊断与血清学诊断。病原学诊断的目的在于确定临床剖检样本中虫体的形态特征,在显微镜下观察头节顶突上有内外两圈排列整齐的小钩,即可判为猪囊尾蚴。若囊尾蚴主要寄生于肝脏,则要注意与亚洲带绦虫囊尾蚴相区别。目前,该病的生前诊断主要采用血清学方法,所用的抗原有虫体抗原、囊液抗原或分泌代谢抗原等,虽然这些抗原的检测敏感性较高,但特异性差,而且抗原来源非常有限。鉴于以上原因,本次对 GB/T 18644—2002《猪囊尾蚴病诊断技术》的修订,除间接 ELISA 所用抗原改为猪囊尾蚴期特异性 18 ku 基因(TS-CC18)重组蛋白外,还增加了血清循环抗原(CAg)检测方法和病原的 PCR 检测方法,以满足猪囊尾蚴病流行病学调查、药物治疗效果评价和动物流通风险评估等不同需求。

本文件的发布机构提请注意,声明符合本文件时,可能涉及到第 6 章间接酶联免疫吸附试验(ELISA)相关的专利使用。

本文件的发布机构对于该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利持有人已向本文件的发布机构保证,他愿意同任何申请人在合理且无歧视的条款和条件下,就专利授权许可进行谈判。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案。相关信息可以通过以下联系方式获得:

专利持有人姓名:才学鹏、张少华、景志忠、骆学农、郭爱疆、郑亚东、窦永喜。

地址:甘肃省兰州市盐场堡徐家坪 1 号。

请注意除上述专利外,本文件的某些内容仍可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。



猪囊尾蚴病诊断技术

1 范围

本标准规定了猪囊尾蚴病的显微镜检查、聚合酶链式反应法(PCR法)、间接酶联免疫吸附试验(间接ELISA)、斑点生物素-亲和素复合物酶联免疫吸附试验(Dot-ABC-ELISA)诊断技术及综合判定。

本标准适用于猪和野猪的囊尾蚴病诊断。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

CNAS-GL 029:2018 基因扩增领域检测实验室认可指南

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

Avidin-HRP:亲和素-辣根过氧化物酶(Avidin-Horseradish Peroxidase)

DAB:二氨基联苯胺(3,3'-Diaminobenzidine)

Dot-ABC-ELISA:斑点生物素-亲和素复合物酶联免疫吸附试验(Dot-Avidin-Biotin-Complex-ELISA)

ELISA:酶联免疫吸附试验(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

HRP:辣根过氧化物酶(Horse Radish Peroxidase)

IPTG:异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(Isopropyl β-D-Thiogalactoside)

NC:硝酸纤维素(Nicrocellulose)

OPD:邻苯二胺(O-phenylenediamine)

PBS:磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline)

PBST:洗涤液(PBS containing 0.5% Tween-20)

PCR:聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction)

TMB:四甲基联苯胺(3,3',5,5'-Tetramethyl Benzidine)

4 显微镜检查

4.1 试剂

生理盐水配制见附录 A 中的 A.1。

4.2 仪器设备

4.2.1 正置生物显微镜。

4.2.2 手术剪、手术刀、镊子。

4.2.3 载玻片。

4.2.4 微量可调移液器(量程为 20 μL ~200 μL)。

4.3 虫体采集

肉眼观察舌肌、咬肌、内腰肌、膈肌、肩胛肌及心脏、肝脏、肺脏等组织,采集有可疑虫体寄生部位的肌肉或内脏组织,用手术刀将其切成约 1 cm 厚的薄片,仔细检查切口有无虫体。成熟的猪囊尾蚴为长椭圆形,大小为(6 mm~10 mm) $\times$ 5 mm,半透明,囊内充满液体,上有一粟粒大小的白色头节。脑内寄生的则为圆球形,直径 8 mm~10 mm。以手术刀和镊子剥离肌肉等组织中的囊尾蚴,用生理盐水洗净。

4.4 压片制备

以手术剪剪开囊壁,取出完整的头节,以滤纸吸干囊液后,将其置于两张载玻片之间并压片。

4.5 显微镜检查

将压片置于低倍显微镜(40 $\times$)下,仔细观察虫体头节的形态和特征。

4.6 显微镜检查结果判定

如虫体头节的顶部有顶突,顶突上有内外两圈整齐排列的小钩,顶突的稍下方有四个均等的圆盘状吸盘(见图 A.1),即判为猪囊尾蚴;如顶突无小钩则判为亚洲带绦虫囊尾蚴。猪囊尾蚴虫体应于-20 $^{\circ}\text{C}$ 或-70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存。

5 PCR 法

5.1 试剂

5.1.1 PCR 试剂

5.1.1.1 10 $\times$ PCR 缓冲液。

5.1.1.2 dNTP 预混液(2.5 mmol/L)。

5.1.1.3 MgCl_2 (25 mmol/L)。

5.1.1.4 Ex Taq 酶(5 U/ μL)。

5.1.2 电泳试剂

5.1.2.1 电泳缓冲液:50 $\times$ TAE 贮存液(见附录 B 中的 B.2.1),临用时加蒸馏水配成 1 $\times$ TAE 缓冲液(见 B.2.2)。

5.1.2.2 琼脂糖:核酸电泳用琼脂糖。

5.1.2.3 电泳加样缓冲液:见 B.2.3。

5.1.2.4 DNA Marker(DNA 标志物):条带大小依次为 100 bp、250 bp、500 bp、750 bp、1 000 bp 和 2 000 bp。

5.2 仪器设备

5.2.1 PCR 扩增仪。

5.2.2 台式低温高速离心机。

5.2.3 稳压稳流电泳仪和水平电泳槽。

5.2.4 凝胶成像仪(或紫外透射仪)。

- 5.2.5 微量可调移液器(量程为 0.1 μL ~2.5 μL 、0.5 μL ~10 μL 、10 μL ~200 μL 、100 μL ~1 000 μL)。
- 5.2.6 无核酸酶的离心管与吸头。
- 5.2.7 PCR 扩增管。

5.3 引物

5.3.1 上游、下游引物序列

根据猪带绦虫线粒体 ND1 部分序列设计如下引物：
——上游引物：5'-CTA GGC CAC TTA GTA GTT TAG TTA-3'；
——下游引物：5'-CAT AAAACA CTC AAA CCT TAT AGA-3'。
PCR 扩增片段的核苷酸序列及引物的位置见 B.1。

5.3.2 引物储存液

用去离子水将每条引物配成 100 $\mu\text{mol/L}$ 的储存液，置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。

5.3.3 引物工作液

将上游、下游引物分别加去离子水配置为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的引物工作液。

5.4 样品

- 5.4.1 猪囊尾蚴虫体的采集，方法同 4.3。
- 5.4.2 阳性对照：用猪囊尾蚴虫体提取的 DNA。
- 5.4.3 阴性对照：依据虫体采集部位，用未感染猪肌肉或肝脏提取的 DNA。

5.5 PCR 操作程序

5.5.1 DNA 提取

用 DNA 提取试剂盒提取囊尾蚴和肌肉的基因组 DNA。DNA 提取应符合 CNAS-GL 029:2018 基因检测实验室区域的设置原则。

5.5.2 PCR 反应体系

采用 50 μL 反应体系，扩增体系包括：	
10 $\times$ PCR 反应缓冲液	5 μL
dNTP(2.5 mmol/L)	4 μL
MgCl ₂ (25 mmol/L)	4 μL
上游引物工作液(10 $\mu\text{mol/L}$)	1 μL
下游引物工作液(10 $\mu\text{mol/L}$)	1 μL
Ex Taq 酶(5 U/ μL)	0.5 μL
DNA 模板	100 ng
去离子水	补足至 50 μL

5.5.3 扩增程序

- 将 PCR 扩增管放入扩增仪中，设定扩增程序：
- 第一阶段，95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min；
 - 第二阶段，95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s，45 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s，共进行 35 个循环；

——第三阶段,72 ℃延伸 5 min。

5.6 扩增产物电泳检测

5.6.1 1.2%琼脂糖凝胶的制备:称取 1.2 g 琼脂糖,加入 100 mL 1×TAE 缓冲液(见 B.2.1 和 B.2.2)中。加热融化后加 5 μ L 质量浓度为 10 mg/mL 的溴化乙锭,混匀后倒入放置于水平台面上的凝胶盘中,胶板厚 5 mm 左右。依据样品数选用适宜的梳子。待凝胶冷却凝固后拔出梳子(胶中形成加样孔),放入电泳槽中,加 1×TAE 缓冲液浸没胶面约 3 mm。

5.6.2 加样:取 10 μ L PCR 扩增产物和 2 μ L 加样缓冲液(见 B.2.3)混匀后加入一个加样孔。每次电泳同时设标准 DNA Marker、阴性对照和阳性对照。

5.6.3 电泳检测:按 5 V/cm 恒压电泳至溴酚蓝染料距离凝胶底部约 1 cm 时,停止电泳,取出凝胶置于凝胶成像仪下观察。

5.7 试验成立条件

阳性对照样品有一条 474 bp 扩增条带,阴性对照无条带或仅有引物二聚体条带(<100 bp),则试验成立。

5.8 PCR 结果判定

待测样品有一条 474 bp 的扩增条带,可判定该虫种为猪囊尾蚴(见图 B.1)。

6 间接 ELISA

6.1 试剂

6.1.1 包被抗原:猪囊尾蚴 TS-CC18 重组抗原。由构建的原核表达载体 pET-28a(+)-TS-CC18 转化大肠杆菌 BL21(DE3),筛选高表达菌株进行诱导表达,采用 Ni 柱亲和层析纯化制备而成。使用时用碳酸盐包被缓冲液(pH 9.6)稀释至工作浓度。

6.1.2 阴性对照血清:健康猪血清。采自 3 月龄非疫区健康猪,剖检确认无猪囊尾蚴感染;猪全血经自然凝结法分离血清。检测时用样品稀释液稀释至工作浓度。

6.1.3 阳性对照血清:猪高免血清。由 TS-CC18 纯化抗原免疫健康猪制备,检测时用样品稀释液稀释至工作浓度。

6.1.4 酶结合物:兔抗猪 IgG-HRP 结合物。检测时用样品稀释液稀释至工作浓度。

6.1.5 碳酸盐包被缓冲液:0.05 mol/L $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 缓冲液(pH 9.6),见附录 C 中的 C.1。

6.1.6 洗涤缓冲液:含 0.5%吐温-20 的 0.002 mol/L PBS(pH 7.2~7.4),见 C.2。

6.1.7 封闭液 1:含 0.25%BSA 和 0.25%酪蛋白等的 0.01 mol/L PBS(pH 7.2~7.4),见 C.3 和 C.4。

6.1.8 样品稀释液:含 0.5% BSA 的 0.02 mol/L PBS(pH 7.2~7.4),见 C.5 和 C.6。

6.1.9 底物溶液:OPD 底物溶液,见 C.7。

6.1.10 终止液:2.0 mol/L 的硫酸溶液,见 C.8。

6.2 仪器设备

6.2.1 台式低温高速离心机。

6.2.2 酶标仪(带 450 nm、490 nm 和 630 nm 波长滤光片)。

6.2.3 酶标板(96 孔)。

6.2.4 与 96 孔酶标板配套使用的振荡器。

6.2.5 血清稀释板。

- 6.2.6 37℃恒温培养箱、湿盒。
- 6.2.7 洗板机或洗涤瓶。
- 6.2.8 单道可调移液器(量程为 0.5 μL~10 μL、10 μL~200 μL、100 μL~1 000 μL 和 1 mL~5 mL)。
- 6.2.9 多道微量可调移液器(量程为 20 μL~300 μL)。
- 6.2.10 与移液器匹配的各种吸头。
- 6.2.11 量筒(100 mL 和 2 000 mL)。
- 6.2.12 计时器。
- 6.2.13 贮液槽。
- 6.2.14 封板膜。
- 6.2.15 纱布和吸水纸等。

6.3 样品

采集猪全血,5 mL/头,置 4℃析出血清后,3 000 g 离心 15 min,取上层血清作为待测样品。

6.4 试验步骤

6.4.1 猪囊尾蚴 TS-CC18 重组抗原制备

构建原核表达载体 pET-28a(+)-TS-CC18,转化大肠杆菌 BL21(DE3),筛选的阳性菌株用终浓度为 0.5 mmol/L 的异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)进行诱导表达,获得带 6 个组氨酸(His)标签的 TS-CC18 重组蛋白;采用 Ni Sepharose 6FF 亲和层析法进行纯化。TS-CC18 重组抗原详细制备及鉴定方法参见附录 D。

6.4.2 酶标板包被及封闭

将纯化的 TS-CC18 蛋白按终浓度 50 μg/mL 稀释于 pH 9.6 的碳酸盐包被缓冲液(见 C.1)中;每孔 100 μL 加入 96 孔酶标板,4℃包被过夜。PBST 洗板 3 次后,每孔加 120 μL 封闭液 1(见 C.4)于 37℃作用 2 h。PBST 洗板 3 次,在干净纱布或吸收纸巾上拍干。经干燥仪充分干燥,用真空包装机密封于铝箔袋中(含干燥剂),贴签,4℃保存备用。

6.4.3 样品

将待检血清及阴性、阳性对照血清用样品稀释液分别作 1:50 稀释(294 μL 样品稀释液加血清 6 μL),混匀备用。

6.4.4 加对照血清和待检血清

参照附录 E 中的图 E.1 加样示例图进行加样。ELISA 板 A1、A2 和 A3 设为空白对照孔,A4、A5 和 A6 加阴性对照血清;H10、H11、H12 加阳性对照血清;其余孔加待检血清样品,每份样品横向测 3 个复孔,每孔 100 μL,用封板膜封口,37℃孵育 60 min。

6.4.5 洗涤

每孔中加 300 μL PBST,重复洗涤 3 次后在吸水纸上拍干。

6.4.6 加酶标抗体

用样品稀释液将兔抗猪酶标抗体稀释至工作浓度(1:20 000),每孔 100 μL,封板后同前孵育 60 min。

6.4.7 再洗涤

每孔中加 300 μL 的 PBST,重复洗涤 4 次后在吸水纸上拍干。

6.4.8 加底物溶液

将分装冻存的 OPD 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中避光溶化,每 10 mL 溶液加入 10 μL 30% H_2O_2 混匀,每孔加 100 μL ,封板,避光 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min~20 min。

6.4.9 加终止液和判读结果

每孔加 50 μL 2 mol/L 的 H_2SO_4 终止液,混匀后在分光光度计 490 nm/630 nm 下判读结果。

6.4.10 试验数据处理

6.4.10.1 计算空白对照的平均 OD_{490} 值。

6.4.10.2 分别计算阴性和阳性对照血清的平均 OD_{490} 值。

6.4.10.3 分别计算每份待检血清样品的平均 OD_{490} 值。

6.4.10.4 根据公式(1)计算待检血清与阴性血清平均 OD 值的比值 P/N :

$$P/N = (A_1 - A_0) / (A_2 - A_0) \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

A_1 ——待检血清样品平均 OD_{490} 值;

A_0 ——空白对照平均 OD_{490} 值;

A_2 ——阴性对照血清平均 OD_{490} 值。

6.5 试验成立条件

当空白对照平均 OD_{490} 值 < 0.10 ,阴性对照血清平均 OD_{490} 值 ≤ 0.30 ,阳性对照血清平均 OD_{490} 值 > 1.0 时,试验成立。

6.6 ELISA 结果判定

待检血清 $P/N \geq 2.1$ 判定为阳性, $P/N < 2.1$ 判为阴性。

7 Dot-ABC-ELISA

7.1 试剂

7.1.1 生物素标记单抗:Bio-1F1、Bio-2B5 和 Bio-6G4 单抗制备及标记参见附录 F。

7.1.2 阴性对照抗原:牛血清白蛋白,检测时用 PBS 稀释至工作浓度(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

7.1.3 阳性对照抗原:猪囊尾蚴 TS-CC18 重组抗原。检测时用 PBS 稀释至工作浓度(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$),制备方法参见附录 D。

7.1.4 Avidin-HRP:亲和素-辣根过氧化物酶标记物。

7.1.5 洗涤缓冲液:PBST,见 C.2。

7.1.6 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.2~7.4):见 C.3。

7.1.7 20%三氯乙酸(TCA):参见附录 G 中的 G.1.1。

7.1.8 封闭液 2:含 1.0%明胶的 0.01 mol/L PBS(pH 7.2~7.4),参见 G.1.2。

7.1.9 DAB 底物溶液:参见 G.1.3。

7.2 仪器设备

- 7.2.1 NC膜(孔径 0.45 μm)。
- 7.2.2 圆形打孔器(直径 6 mm~8 mm)。
- 7.2.3 1.5 mL 微量离心管。
- 7.2.4 单道可调移液器(量程为 0.5 μL ~10 μL 、10 μL ~200 μL 和 100 μL ~1 000 μL)。
- 7.2.5 与各移液器匹配的标准吸头。
- 7.2.6 台式低温高速离心机。
- 7.2.7 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱。
- 7.2.8 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床。
- 7.2.9 平皿、锥形瓶。
- 7.2.10 量筒(100 mL 和 1 000 mL)。
- 7.2.11 暗盒。

7.3 样品

采集猪全血,5 mL/头,置 4 $^{\circ}\text{C}$ 析出血清后,3 000 g 离心 15 min,取上层血清用等体积 20% TCA 室温沉淀 20 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 g 离心 10 min,吸取上清于干净离心管中,作为待检样品。

7.4 试验步骤

7.4.1 NC膜预处理

裁切 NC 膜,大小 0.8 cm $\times$ 10 cm,可供检测 10 个样/条;点样处用圆形打孔器压迹,备用。

7.4.2 待检样品固定

取待检样品加至 NC 膜点样处,5 μL /点,37 $^{\circ}\text{C}$ 结合至少 2 h。

7.4.3 洗涤

将固定样品的 NC 膜置于干净平皿,PBST 重复漂洗 3 次。

7.4.4 封闭

将 NC 膜置于封闭液 2 中,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。同 7.4.3 洗涤。

7.4.5 加生物素标记的单抗

将生物素标记的单抗 Bio-1F1、Bio-2B5 和 Bio-6G4 按 1 : 1 : 1 混匀,用 PBS 稀释(工作浓度均为 1 : 100)。将 NC 膜置于稀释好的抗体工作液中,37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床(50 r/min)孵育 1 h,取出 NC 膜,用 PBST 进行洗涤。

7.4.6 加亲和素-酶标记物

用 PBS 稀释 Avidin-HRP(工作浓度 1 : 500),与 NC 膜于 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床(50 r/min)孵育 1 h。移去液体,洗涤同 7.4.3。

7.4.7 加底物溶液

将 NC 膜置于新鲜配制的 DAB 显色液中,避光反应 3 min~5 min。

7.4.8 反应终止

显色后迅速取出 NC 膜置于 PBST 中终止反应,观察斑点显色强度。

7.5 试验成立条件

阳性对照孔出现棕色斑点,阴性对照孔无色或接近无色者试验成立。

7.6 Dot-ABC-ELISA 结果判定

待检样品斑点显色者(++:棕色;+:浅棕色)判定为阳性,无色或接近无色者判定为阴性(参见图 G.1)。

8 综合判定

8.1 受检样品经第 6 章 ELISA 检测出猪囊尾蚴抗体的,判定为该动物猪囊尾蚴抗体阳性。该结果可用于猪囊尾蚴病宰前检疫的初筛和流行病学调查、监测。

8.2 受检样品经第 7 章 Dot-ABC-ELISA 检测出猪囊尾蚴抗原的,判定为该动物猪囊尾蚴抗原阳性。该结果可用于猪囊尾蚴活虫感染的检测和药物疗效评价。

8.3 受检样品经第 4 章显微镜检查 and 第 5 章 PCR 法任一项鉴定为猪囊尾蚴虫体的,确诊该动物感染猪囊尾蚴。

8.4 检疫方法根据屠宰场具体条件进行选择。

附录 A

(规范性附录)

生理盐水及猪囊尾蚴头节形态特征

A.1 生理盐水

生理盐水配制如下：

氯化钠

0.85 g

去离子水

100 mL

A.2 猪囊尾蚴头节形态特征

猪囊尾蚴头节形态特征见图 A.1。

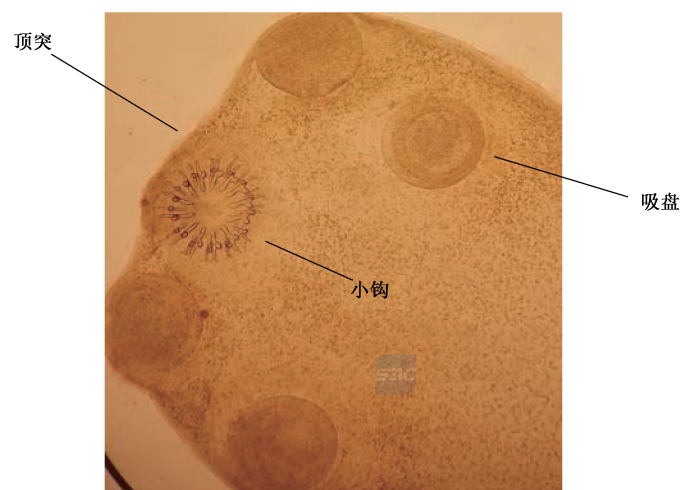


图 A.1 猪囊尾蚴头节形态特征

附 录 B (规范性附录)

PCR 引物位置、溶液配制及电泳结果

B.1 PCR 引物位置

```

7381 AAAATAGTGA TTTGTCTAGT CATAGATAGT AGTTTAATAA CTAGGCCACT TAGTAGTTTA
7441 GTTAAAATGA TTAATTTTGG GTTTATTAGT GGTTTTATGG GTTTGTTAAT TTGTTTATTA
7501 ATTATAGCTT TTTTATATT AGGGGAACGT AAGATTTTGG GTTATCTCA ATTCGTAAG
7561 GGTCTAATA AGGTTGGTAT TGTAGGATTG TTACAAAGGT TTTCTGATTT ATTAAAGTTG
7621 ATAATTAAGT TTAAGAATTG TGGATTCAG AGTCGTAGTT GAGTTGGTTT GTTTGGGGTT
7681 ATGTTGTTGG TTAGTTTAGT TATTATTAT TCAATTGTAT ATGGTGGTTA TTATAGGTAT
7741 AGGTTTAAAT CTCTTTCTTT GTTATGGTTT TTGGTTATAA CTAGATTTTG TAGTTATTCG
7801 ATATTATGTA CGGGTTGAGG TAGTTATAAA AGTTATTCGT TTTTAAGTTC AATTCGTTGT
7861 GCTTTTAGGT CTATAAGGTT TGAGGCTTGT TTTATGAGTA TTATAATATT TACTGCATTG
  
```

注：阴影部分为引物的位置。

B.2 溶液配制

B.2.1 50×TAE 贮存液

三羟甲基氨基甲烷(Tris)	242.0 g
乙二胺四乙酸(EDTA)	18.6 g
冰乙酸	57.1 mL
加去离子水至	1 000 mL

B.2.2 1×TAE 缓冲液

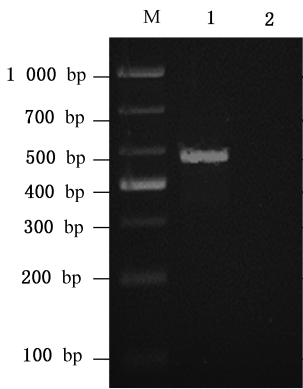
使用前将 50×TAE 作 50 倍稀释即可。

B.2.3 电泳加样缓冲液

溴酚蓝	0.25 g
甘油	30.0 mL
去离子水	70.0 mL

B.3 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果见图 B.1。



说明：
M —— Marker(Marker 为核酸分子量标准)；
1 —— 猪带绦虫；
2 —— 阴性对照。

图 B.1 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

附 录 C
(规范性附录)
ELISA 试剂及其配制

C.1 包被缓冲液 (CBS, 0.05 mol/L $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$, pH 9.6)

无水碳酸钠(Na_2CO_3)	1.59 g
无水碳酸氢钠(NaHCO_3)	2.93 g
去离子水	1 000 mL
2 ℃~8 ℃保存 1 个月有效。	

C.2 PBST (pH 7.2~7.4)

磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2.9 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.2 g
氯化钾(KCl)	0.2 g
氯化钠(NaCl)	8.0 g
吐温-20	0.5 mL
加去离子水至	1 000 mL

C.3 0.01 mol/L PBS (pH 7.2~7.4)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.9 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.3 g
NaCl	8.5 g
加去离子水至	1 000 mL
103.4 kPa 高压蒸汽灭菌 20 min, 4 ℃冰箱保存。	

C.4 封闭液 1

牛血清白蛋白(BSA)	0.25 g
酪蛋白	0.25 g
蔗糖	2.0 g
灭菌 0.01 mol/L PBS(pH 7.2~7.4)	100 mL
加 Proclin300(防腐剂)0.1 mL, 充分混匀, 4 ℃保存或-20 ℃冻存。	

C.5 0.02 mol/L PBS(pH 7.2~7.4)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	5.8 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.6 g
NaCl	17.0 g

加去离子水至 1 000 mL
103.4 kPa 高压蒸汽灭菌 20 min,4 ℃冰箱保存。

C.6 样品稀释液

牛血清白蛋白(BSA) 0.5 g
吐温-20 0.05 mL
0.02 mol/L PBS(pH 7.2~7.4) 100 mL
加 Proclin300(防腐剂)0.1 mL,充分混匀,4 ℃保存或-20 ℃冻存。

C.7 OPD 底物溶液

磷酸盐-柠檬酸片剂 1 片
邻苯二胺片剂(OPD) 2 片
去离子水 100 mL

定量分装(5 mL/瓶或 10 mL/瓶),避光-20 ℃保存。用前避光溶化,每 10 mL 溶液加入 10 μL 30% 双氧水(H₂O₂),立即使用。

C.8 终止液(2.0 mol/L 浓硫酸)

取 112 mL 分析纯浓硫酸(H₂SO₄)缓慢加入 888 mL 去离子水中,混匀,分装室温保存。



附 录 D (资料性附录)

猪囊尾蚴 TS-CC18 重组蛋白的制备

D.1 重组菌

将猪囊尾蚴 18 ku 糖蛋白基因(TS-CC18)构建于 pET-28a(+)表达载体,并转化大肠杆菌 BL21(DE3),命名为 pET-28a(+)-TS-CC18/BL21(DE3), $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

D.2 TS-CC18 重组蛋白表达

D.2.1 重组菌复苏

取 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存的 pET-28a(+)-TS-CC18/ BL21(DE3)重组菌按 1 : 100 的比例接种于 10 mL 的 LB 选择性培养基(含 $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、230 r/min 振摇过夜。

D.2.2 重组菌诱导表达

取 D.2.1 中过夜培养物 10 mL 接种于 1 000 mL LB 选择性培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、230 r/min 振摇至 OD_{600} 为 0.5~1.0,加入 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L , $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 诱导表达 6 h。

D.3 TS-CC18 重组蛋白的纯化

D.3.1 包涵体的洗涤及溶解

用 25 mL 洗涤缓冲液(0.05 mol/L Tris-HCl, 0.15 mol/L NaCl, 0.2% TritonX-100, 1.4 mL β -巯基乙醇, $\text{pH } 7.4$)重悬菌体, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反复冻融 3 次,加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ 10 mg/mL 溶菌酶、 $10\text{ }\mu\text{L}$ 100 mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF)及 $25\text{ }\mu\text{L}$ TritonX-100,置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱温育 15 min 后,在冰浴中超声破碎菌体 20 min(功率 600 W,工作 3 s,间歇 5 s)。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $13\text{ }000\text{ g}$ 离心 10 min 收集沉淀。将收集的沉淀用洗涤缓冲液充分重悬,加入终浓度为 0.2% 脱氧胆酸钠(DOC),混匀,室温静置 20 min, $13\text{ }000\text{ g}$ 离心 10 min 收集包涵体沉淀;反复洗涤 3 次。再以含终浓度 2% DOC 的洗涤缓冲液同上洗涤包涵体 3 次。在洗涤后的包涵体中加入结合缓冲液(0.05 mol/L Tris-HCl, 0.15 mol/L NaCl, 0.2% TritonX-100, 1.4 mL β -巯基乙醇, 10 mmol/L 咪唑, 8 mol/L 尿素, $\text{pH } 7.4$)使沉淀慢慢溶解,室温静置约 1 h。 $13\text{ }000\text{ g}$ 离心 10 min,收集上清。

D.3.2 镍柱亲和纯化蛋白

按 Ni Sepharose 6FF 说明书操作进行亲和层析纯化目的蛋白。每 1 L 培养物的包涵体裂解液中加入 2 mL Ni Sepharose 6FF 填料进行结合,再用 100 mL 结合缓冲液洗去杂蛋白。将 200 mmol/L ~ 400 mmol/L 咪唑梯度洗脱的 TS-CC18 重组蛋白合并、浓缩后,用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析蛋白浓度及纯化效果。

D.4 TS-CC18 重组蛋白检测

D.4.1 SDS-PAGE

取重组蛋白样品,加入 2×蛋白上样缓冲液混匀,水浴煮沸 5 min 上样。用 80 V 电压电泳至溴酚蓝到分离胶,把电压提高到 120 V,继续电泳至溴酚蓝到达凝胶底部。取下凝胶,用考马斯亮蓝染色 2 h 后脱色,待蓝色背景脱净后,观察和分析电泳结果。

D.4.2 纯化蛋白浓度测定

用紫外分光光度法测定 TS-CC18 重组蛋白浓度,根据公式(D.1)计算蛋白浓度:

$$M = (1.45 \times OD_{280} - 0.74 \times OD_{260}) \times N \dots\dots\dots (D.1)$$

式中:

M ——蛋白浓度,单位为毫克每毫升(mg/mL);

N ——稀释倍数。

以 $OD_{280}/OD_{260} > 1.6$ 为蛋白纯度合格。



附 录 E
(资料性附录)
间接酶联免疫吸附试验的加样

图 E.1 为间接酶联免疫吸附试验加样示例图。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	空白对照	空白对照	空白对照	阴性对照	阴性对照	阴性对照	样品 1	样品 1	样品 1	样品 2	样品 2	样品 2
B	样品 3	样品 3	样品 3	样品 4	样品 4	样品 4	样品 5	样品 5	样品 5	样品 6	样品 6	样品 6
 C	样品 7	样品 7	样品 7	样品 8	样品 8	样品 8	样品 9	样品 9	样品 9	样品 10	样品 10	样品 10
D	样品 11	样品 11	样品 11	样品 12	样品 12	样品 12	样品 13	样品 13	样品 13	样品 14	样品 14	样品 14
E	样品 15	样品 15	样品 15	样品 16	样品 16	样品 16	样品 17	样品 17	样品 17	样品 18	样品 18	样品 18
F	样品 19	样品 19	样品 19	样品 20	样品 20	样品 20	样品 21	样品 21	样品 21	样品 22	样品 22	样品 22
G	样品 23	样品 23	样品 23	样品 24	样品 24	样品 24	样品 25	样品 25	样品 25	样品 26	样品 26	样品 26
H	样品 27	样品 27	样品 27	样品 28	样品 28	样品 28	样品 29	样品 29	样品 29	阳性对照	阳性对照	阳性对照

图 E.1 ELISA 加样示例图

附录 F

(资料性附录)

猪囊尾蚴 TS-CC18 和烯醇化酶单克隆抗体的制备

F.1 免疫抗原

构建猪囊尾蚴 TS-CC18 和烯醇化酶 TsENO 基因原核表达载体 pET-28a(+)-TS-CC18 和 pET-30a(+)-TsENO, 分别转化大肠杆菌 BL21(DE3), 筛选高表达菌株; 以终浓度 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 TS-CC18 和 TsENO 重组蛋白; 采用 Ni Sepharose 6FF 亲和层析法进行纯化获得 TS-CC18 和 TsENO 蛋白, 测定浓度分装, -70°C 保存。

F.2 动物免疫

采用常规方法免疫 BALB/c 小鼠, 一共 4 次, 免疫间隔 21 d。首次免疫取 0.01 mol/L PBS 稀释的抗原与等体积弗氏完全佐剂混合, 充分乳化后, 经背部、皮下、腋窝、腹股沟多点注射, $50\text{ }\mu\text{g/只}$, 共免疫 5 只; 第 2 次、第 3 次免疫将抗原与等体积弗氏不完全佐剂混合, 充分乳化后, 经背部、皮下及足跖部, 注射抗原量倍增; 第 4 次经尾静脉注射进行加强免疫。

F.3 抗体效价测定

采用间接 ELISA 方法, 以包被液将 TS-CC18 和 TsENO 抗原均稀释至工作浓度 ($10\text{ }\mu\text{g/mL}$), 分别包被 96 孔酶标板(防止产生气泡), 每孔 $100\text{ }\mu\text{L}$, 37°C 水浴作用 2 h 后置 4°C 过夜。以 PBST 洗涤 3 次, 在纸巾上拍干。每孔加入 $120\text{ }\mu\text{L}$ 封闭液 1(见 C.4), 37°C 封闭 2 h, 沥干; 加入 $1:40\sim 1:20\,480$ 倍比稀释的免疫小鼠血清, 并以正常小鼠的血清作阴性对照。 37°C 孵育 30 min, PBST 洗涤 4 次。加入羊抗鼠 IgG-HRP, 37°C 孵育 30 min, PBST 洗涤 5 次。以 TMB 显色液避光显色 10 min, 2 mol/L 硫酸终止反应。酶标检测仪测定 OD_{450} 值; 效价达到 $1:20\,480$ 为免疫合格, 取效价最高的小鼠脾脏进行细胞融合。

F.4 杂交瘤细胞株的建立

F.4.1 骨髓瘤细胞的复苏、培养和处理

将冻存 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞从液氮中取出后, 立即放到 37°C 温水中溶解, $1\,000\text{ g}$ 离心 10 min。无菌条件下用吸管吸取上清, 然后用无血清的 RPMI-1640 洗涤, 混匀后加入细胞培养瓶中, 用含 20% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养液进行培养。把细胞培养瓶置于 5% CO_2 、 37°C 恒温培养箱中进行传代培养。每隔 1 d 传一次, 一瓶传两瓶。在进行传代培养的时候, 用 8-氮鸟嘌呤进行处理, 每瓶 $100\text{ }\mu\text{L}$, 选择其中生长良好的骨髓瘤细胞进行融合。

F.4.2 饲养细胞的准备

在超净工作台上, 取健康的成年小鼠的腹腔细胞混于 60 mL HAT 培养基中, 按每孔 $100\text{ }\mu\text{L}$ 转入到 96 孔细胞培养板中, 共 6 板。在显微镜下进行细胞计数, 使饲养细胞的数量达到 10^5 个/mL, 以促进

融合细胞的生长。

F.4.3 脾细胞的准备

在超净工作台上,取抗体效价最高的免疫小鼠脾脏,置于金属网中,用注射器芯轻轻研磨,并用 20 mL 无血清 RPMI-1640 培养基冲洗脾脏细胞。将脾细胞悬液转移到 10 mL 离心管中,1 000 *g* 离心 5 min,弃上清,用 10 mL 无血清 RPMI-1640 悬浮,细胞计数。

F.4.4 细胞的融合

将培养好的 6 瓶~8 瓶骨髓瘤细胞转移到 50 mL 离心管中,1 000 *g* 离心 5 min。弃上清,用 10 mL 无血清 RPMI-1640 悬浮,显微计数。脾细胞与骨髓瘤细胞按 10 : 1 混合,以 PEG 4000 融合后转入到含有饲养细胞的 96 孔培养板中,每孔 100 μ L,于 37 $^{\circ}$ C 在 5% CO_2 的细胞培养箱中培养。

F.4.5 杂交瘤细胞的筛选

观察杂交瘤细胞生长状况。第 6 天用 HAT 培养基进行第 1 次半量换液,在第 8 天左右,待细胞长到 1/4~1/3 时以 TS-CC18 和 TsENO 进行间接 ELISA 检测,选出阳性细胞进行后续克隆。

F.4.6 杂交瘤细胞的克隆化培养

将 ELISA 检测阳性的杂交瘤细胞用有限稀释法及时进行克隆,9 d 左右以间接 ELISA 检测克隆细胞上清;选择克隆数少、OD₄₅₀ 高的阳性孔,将其再次克隆。经 3 次~4 次克隆,直到阳性率 100%。

F.4.7 杂交瘤细胞的扩大培养

单克隆细胞株经过几次克隆阳性率达到 100%后,将细胞从 96 孔培养板转入 24 孔培养板中,再由 24 孔板转入细胞培养瓶中进行扩大培养。

F.5 单克隆抗体的大量制备

取 BALB/c 小鼠腹腔注射 0.5 mL 液体石蜡(高压灭菌),7 d~10 d 后腹腔注入 1×10^6 个~ 5×10^6 个杂交瘤细胞,注射后 7 d~10 d 可见小鼠腹部明显膨大,进行无菌操作采集腹水。用吸管收取腹水,1 000 *g* 离心 10 min,弃去最上层的脂肪,收集中间层液体,即为单克隆抗体腹水。

F.6 单克隆抗体的鉴定

F.6.1 腹水效价测定

用 TS-CC18 和 TsENO 抗原间接 ELISA 进行测定,腹水进行 $10 \sim 10^{10}$ 系列稀释。用酶标仪读取 OD₄₅₀ 的值,与小鼠阴性对照血清 OD₄₅₀ 值进行比较, P/N 比值 ≥ 3 的腹水最低稀释倍数,即为腹水效价。

F.6.2 抗体亚类鉴定

亚类鉴定采用免疫球蛋白标准亚类鉴定试剂盒(IsoStrip mouse MAb isotyping kit)进行鉴定,具体步骤按试剂盒的说明书操作。

F.7 单克隆抗体的纯化

收集的腹水依次用 50% 及 33% 的饱和硫酸铵沉淀进行粗提纯化,透析后经 HiTrap Protein G HP 纯化获得高纯度单克隆抗体。采用二喹啉甲酸(BCA)法进行抗体浓度测定。

F.8 抗原位点分析

用 ELISA 叠加试验进行抗原位点分析,用酶标检测仪测定 OD₄₅₀ 值。按公式(F.1)计算叠加系数。叠加系数大于 50% 时各单抗即为针对不同的抗原位点。

$$AI = [2 \times A_{(1+2)} / (A_1 + A_2) - 1] \times 100\%$$

.....(F.1)

- 式中:
- AI

——

抗原叠加系数;
- A₁

——

单克隆抗体 1 的 OD₄₅₀ 值;
- A₂

——

单克隆抗体 2 的 OD₄₅₀ 值;
- A₍₁₊₂₎

——

单克隆抗体 1 和单克隆抗体 2 混合的 OD₄₅₀ 值。

F.9 单抗的生物素标记

用二甲基亚砜(DMSO)配制 10 mg/mL 的 N-羧琥珀酰亚胺生物素(NHSB),纯化的抗体按浓度 1 mg/mL~3 mg/mL 溶解于 0.1 mol/L 的碳酸氢钠溶液(pH 9.0)中。每毫克抗体加入 25 μg~250 μg 的生物素酯,混匀后,室温作用 4 h。按每 250 μg 生物素酯加入 20 μL 1 mol/L 的 NH₄Cl 终止反应,室温放置 10 min。在 4 ℃ 下对 0.01 mol/L PBS(pH 7.2~7.4)透析 24 h,期间换液 4 次,以除去未结合的游离生物素。标记抗体分装后-20 ℃冻存。



附 录 G
(资料性附录)

Dot-ABC-ELISA 相关试剂配制及结果判定

G.1 Dot-ABC-ELISA 相关试剂

G.1.1 20%三氯乙酸

称取 20 g 三氯乙酸(TCA)溶于 100 mL 去离子水中,4 ℃ 保存。

G.1.2 封闭液 2

明胶	1.0 g
0.01 mol/L PBS(pH 7.2~7.4)	100 mL

G.1.3 DAB 底物溶液

DAB 底物溶液使用商品化试剂盒,操作步骤参照使用说明进行。

G.2 Dot-ABC-ELISA 的结果判定

Dot-ABC-ELISA 检测结果参见图 G.1。

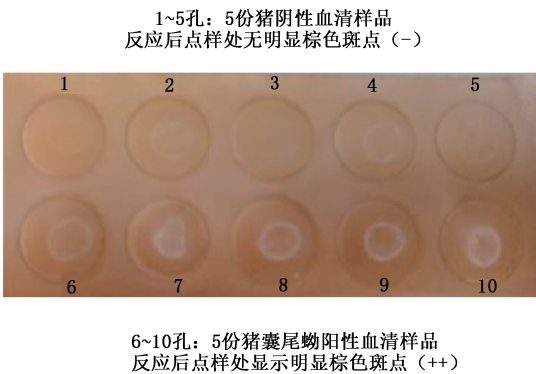


图 G.1 Dot-ABC-ELISA 检测结果