

中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX
代替 GB/T 14927.2-2008

实验动物 近交系小鼠、大鼠免疫标记检测 法

Laboratory animal—Method for examination of *Toxoplasma gondii*

（工作组讨论稿）

（本草案完成时间：2026-08-28）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 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

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 近交系小鼠和大鼠皮肤移植法 2

 4.1 技术原理 2

 4.2 设备和材料 2

 4.3 抽样 3

 4.4 背部皮肤移植术 3

 4.5 尾部皮肤移植法 4

 4.6 判定标准 5

5 近交系小鼠 H-2 单倍型检测方法—微量细胞毒法 5

 5.1 技术原理 5

 5.2 设备与材料 5

 5.3 操作 6

附录 A（资料性） 6 8

图 1 皮肤移植相互循环系统 4

表 A.1 常用近交系小鼠 H-2 单倍型 8

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

GB/T 14927共分2个部分

—第1部分为《实验动物 近交系小鼠、大鼠生化标记检测法》。

—第2部分为《实验动物 近交系小鼠、大鼠免疫标记检测法》。

本部分为GB/T 14927的第2部分。

本部分执行之日起代替GB/T 14927.2-2008《实验动物 近交系小鼠、大鼠免疫标记检测法》。

本部分与GB/T 14927.2-2008相比主要技术差异如下：

- a) 增加了规范性引用文件，引入了 GB 14923、GB/T 35823 及 GB/T 35892 等标准。
- b) 增加了术语和定义，对单倍型、组织相容性复合体、H-2复合体、H-2单倍型、皮肤移植术、同系移植和同种移植等术语进行了界定。
- c) 规范了实验动物的抽样要求，明确按 GB 14923 执行，并增加了动物编号、称量体重及谱系信息记录等要求。
- d) 完善了皮肤移植过程中的动物福利、麻醉与环境控制要求，增加了麻醉保温垫、局部镇痛制剂，并明确了麻醉生效判定依据以及符合 GB/T 35823 和 GB/T 35892 的相关规定。
- e) 细化了背部和尾部皮肤移植的操作细节，规范了消毒顺序与范围、纱布裁剪具体规格、术后单笼饲养与保温苏醒等要求。
- f) 补充和完善了皮肤移植结果的观察与判定标准，明确了种群遗传质量合格与不合格的判定依据及执行标准。
- g) 修订了微量细胞毒法部分内容，更新了部分单克隆抗体型号，并规范了离心设备的技术参数及离心力单位。

本部分附录A为资料性附录。

本部分由全国实验动物标准化技术委员会提出并归口。

本部分由全国实验动物标准化技术委员会负责起草。

本部分主要起草人：李长龙、王洪、万娟、向志光、岳秉飞、张国忠、戴方伟、霍学云。

本文件及其所替代文件的历次版本发布情况。

——1994年首次发布为GB/T 14927.2-1994，2001第一次修订，2008年第二次修订。

——本次是第三次修订。

实验动物 近交系小鼠、大鼠免疫标记检测法

1 范围

本部分规定了近交系小鼠、大鼠皮肤移植术和近交系小鼠H-2单倍型检测方法。

本部分近交系小鼠、大鼠皮肤移植术适用于近交系小鼠和大鼠在培育过程中遗传纯度检查及在饲养繁殖过程中的遗传监测；近交系小鼠H-2单倍型检测方法适用于近交系小鼠培育和繁殖饲养过程中的遗传监测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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。

GB 14923 实验动物 遗传质量控制

GB/T 35823 实验动物 动物实验通用要求

GB/T 35892 实验动物 福利伦理审查指南

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

单倍型 haplotype

位于同一条染色体上、位置相邻且紧密连锁的一组等位基因构成的基因组合。

3.2

组织相容性复合体 major histocompatibility complex, MHC

编码主要组织相容性抗原的一簇紧密连锁基因，其表达产物参与抗原提呈、移植排斥调控及机体免疫应答过程。

3.3

H-2 复合体 H-2 Complex

小鼠的主要组织相容性复合体（MHC），定位于小鼠17号染色体，包含K、D等功能区域，是调控小鼠免疫应答与移植排斥反应的核心基因群。

3.4

H-2 单倍型 H-2 Haplotype

近交系小鼠H-2复合体中所有基因位点的特定等位基因组合，通常以“H-2”后加字母或数字标识（如H-2^b、H-2^d），为鉴别近交系小鼠遗传背景的核心遗传标记。

3.5

皮肤移植术 skin grafting

本文件规定的专用试验方法，指将供体小鼠、大鼠皮肤组织移植至受体动物对应体表部位，依据移植植物存活情况判定供、受体动物遗传同源性的试验操作。

3.6

同系移植 syngeneic transplantation

在遗传背景完全相同个体间开展的组织、器官移植。

3.7

同种移植 allogeneic transplantation

同一物种内、遗传背景存在差异个体之间开展的组织、器官移植。

4 近交系小鼠和大鼠皮肤移植法

4.1 技术原理

本文件规定的背部皮肤移植术与尾部皮肤移植术的技术原理一致，且具有同等标准效力。

本方法基于近交系动物基因纯合性和遗传同源性原理：同一近交系动物个体基因型高度纯合、组织相容性抗原完全一致，开展同系移植时不会产生免疫排斥反应，移植皮肤可长期存活；不同近交品系动物基因型及组织相容性抗原存在差异，开展同种移植时会触发特异性免疫排斥反应，移植皮肤最终坏死脱落。

近交系动物杂交后代的移植免疫规律如下：

- a) F1代动物可接受任一亲本的组织移植植物，而亲本无法接受F1代的组织移植植物。
- b) F1代动物可接受F2代及以后各代动物的组织移植植物。

亲本品系仅能接受部分F2代及以后各代动物的组织移植植物，绝大多数情况下会发生排斥。

4.2 设备和材料

- a) 手术刀柄和尖刀片（11号）。
- b) 眼科剪刀。
- c) 眼科镊子。
- d) 固定板（18 cm×12 cm）。
- e) 一次性注射器（1 mL）。
- f) 脱脂棉球。
- g) 玻璃套管（直径8 mm）。
- h) 无菌戊巴比妥钠溶液（0.7%）。
- i) 医用橡皮膏。
- j) 医用凡士林。
- k) 粉剂青霉素G钠（80万U，人或兽用）。
- l) 3%碘酒棉球。
- m) 75%酒精棉球。
- n) 纱布（裁剪长度为（40±2）mm、宽度（25±2）mm的规格，厚度为2~3层的规格，数量按需准备，且每块纱布均需均匀涂布医用凡士林与粉剂青霉素G钠）。
- o) 手术器材应高压灭菌。
- p) 麻醉保温垫。

4.3 抽样

本试验动物抽样按GB 14923规定执行。

抽样完成后对受试动物逐只编号、称量体重，并完整记录品系名称、性别、出生日期、谱系信息及遗传概貌特征，遗传特征判定依据遵循GB 14923中微量细胞毒试验结果判定标准。

4.4 背部皮肤移植术

4.4.1 操作

4.4.1.1 应选择适宜的麻醉剂及剂量，建立实验动物麻醉操作规程，符合 GB/T 35823 的相关要求；手术环境温度应控制在 25℃~28℃，手术过程应符合 GB/T 35892 的相关规定。

4.4.1.2 以动物夹尾反射消失、呼吸平稳作为麻醉生效判定依据。将麻醉后动物俯卧固定于固定板上，剔除背部手术区域被毛。遵循由内向外的消毒顺序，依次采用 3%碘酒棉球、75%乙醇棉球对术区进行皮肤消毒，消毒范围超出手术切口边缘不小于 5 mm。

4.4.1.3 在动物背部对称剪取 2 块直径 5~10 mm 的全层皮肤，分别用于自体移植与异体移植。

皮片置于盛有少量无菌生理盐水的无菌平皿中，使用眼科剪刀轻柔剔除皮下结缔组织，仅保留真皮层组织，完成修整后经无菌生理盐水单次冲洗备用。

4.4.1.4 取两只已制备好皮片的动物，按以下方式进行移植：每只动物左侧手术区移植自身制备的皮片（自体移植）；2 只动物的右侧手术区进行皮片循环交换（异体移植）；移植时皮片需按逆毛方向放置，确保皮片与受区皮肤紧密吻合。

4.4.1.5 移植完成后，覆盖 3~4 层浸有凡士林与青霉素 G 钠混合物的无菌纱布块，用 1 cm 宽橡皮膏固定，松紧度以不影响动物呼吸及肢体活动、且纱布不移位为宜。

4.4.1.6 待动物自主呼吸恢复后，移至保温苏醒箱，直至能正常活动，期间避免打扰。然后将其放入标注有实验信息的笼盒内单只饲养，避免相互撕咬导致包扎脱落或皮片损伤；术后 10 天拆除包扎，观察皮片存活情况。

4.4.1.7 待动物自主呼吸恢复后，移至保温苏醒箱，直至能正常活动，期间避免打扰。然后将其放入标注有实验信息的笼盒内单只饲养，避免相互撕咬导致包扎脱落或皮片损伤；术后 10 天拆除包扎，观察皮片存活情况。

4.4.2 结果观察与判定

4.4.2.1 手术成功判定

拆除包扎后，移植皮片自然脱痂、创面平整，且术后1周内术区出现新生毛发，判定为手术成功。若移植皮片干瘪、脱落，判定为手术技术失败。本方法手术技术失败率应不高于10%。

拆除包扎后，若移植皮片出现干瘪、脱落现象，即判定为技术失败；与自体移植效果对照，技术失败率需控制在10%以内。

- a) 急性排斥：移植皮片在术后 2 周~3 周内发生脱落，判定为急性排斥，多提示动物存在遗传污染。
- b) 慢性排斥：移植皮片在术后 3 周后发生脱落，判定为慢性排斥。试验应持续观察不少于 100 d，用于判定慢性排斥反应，该现象多由动物遗传突变导致。

4.4.2.2 异常情况处理原则

当检测结果存在可疑、无法判定，或手术技术失败率超过10%时，应重新开展移植试验。复测可选用全新受试动物，亦可复用本次结果存疑的试验动物；复用动物再次移植时，排斥反应发生更快、表现更典型，可辅助结果判定。

4.5 尾部皮肤移植法

4.5.1 操作

4.5.1.1 按照 4.4.1.1 的方法麻醉动物

4.5.1.2 动物麻醉生效后，按 5 只为一组，将动物仰卧固定于滤纸上。依次使用 3%碘酒棉球、75%乙醇棉球对鼠尾整体进行彻底消毒。

4.5.1.3 操作人员以左手食指按压动物尾根、拇指固定尾尖，使鼠尾保持轻微伸展状态；右手持解剖刀，刀刃朝上，与尾部皮肤呈 20°~30° 夹角，于距尾尖 5 mm 处、尾静脉上方或两条尾静脉之间位置，削取宽度 2 mm~3 mm、长度 7 mm~8 mm 的皮肤皮片。皮片采集厚度需满足：术中无明显出血、充分暴露白色肌腱，且不损伤尾部血管。

4.5.1.4 将解剖刀逆时针转交至左手，使刀片附着的皮片同步翻转 180°；使用眼科镊子取下皮片，贴合覆盖于原取材创面，保证皮片与创面紧密吻合。覆盖小片滤纸轻压固定后移除滤纸，完成自体移植对照操作。

4.5.1.5 按照 4.5.1.3 和 4.5.1.4 步骤，完成同组内其余 4 只动物的自体移植对照操作。

4.5.1.6 参照本小节操作流程及皮肤移植相互循环系统（见图 1），开展组内异体循环交叉移植：将前一只动物的第三片皮片与相邻后一只动物的第二片皮片进行互换移植。移植完成后，取规格直径 8 mm 的玻璃套管，轻柔套入每只动物鼠尾，套管伸入深度距尾根约 3 mm；在鼠尾远端套管外侧，使用医用胶布缠绕 2 圈~3 圈固定，保证套管可轻微上下活动且不脱落。

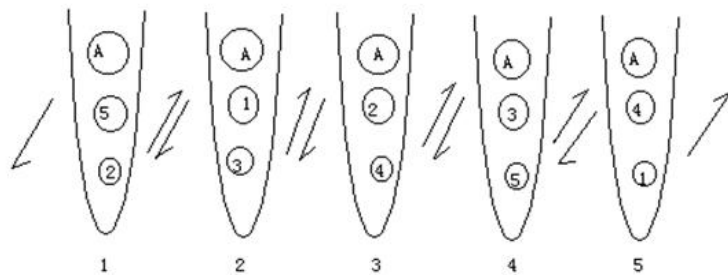


图 1 皮肤移植相互循环系统

注：A表示自体移植对照；圆圈中的阿拉伯数字表示皮片供体小鼠的编号

4.5.1.7 套管固定完成后，采用手术灯持续照射鼠尾创面 15 min~30 min。照射结束后，将动物仰卧放置于饲养笼盒内，悬挂标识卡片，记录试验相关信息。

4.5.1.8 移植 24 h 后，拆除鼠尾玻璃套管，观察确认皮片稳定贴合创面。

4.5.2 结果观察与判定

4.5.2.1 移植成功判定

在100 d的观察期内，若移植皮片始终保持逆毛状态，无脱落、坏死等异常，即判定为移植物永久接受。

4.5.2.2 技术失败判定

移植后1周内，皮片出现苍白、干瘪、最终脱落，即判定为技术失败。本方法手术技术失败率应不高于10%。

4.5.2.3 排斥反应判定

急性排斥：移植后2~3周内，皮片出现发炎、水肿、坏死并结痂脱落现象，判定为急性排斥，该结果通常提示受试动物存在遗传污染。

慢性排斥：移植后3~9周内，皮片逆毛逐渐脱落至完全无毛，或因排斥反应遗留凹陷性疤痕，即判定为慢性排斥，该结果通常由受试动物遗传突变导致。

4.5.2.4 结果异常处置

当对检测结果存疑，或技术失败率超出10%时，应重新开展尾部皮肤移植试验，确保检测结果准确、可靠。

4.6 判定标准

同品系动物间异体移植全部存活，判定该种群遗传质量合格；若出现非手术操作因素导致的移植物排斥反应，则判定该种群遗传质量不合格，判定依据执行GB 14923相关规定。

5 近交系小鼠 H-2 单倍型检测方法—微量细胞毒法

5.1 技术原理

MHC是可诱发强烈移植排斥反应的抗原基因群。小鼠对应的MHC为H-2复合体。不同近交系小鼠H-2单倍型存在差异，H-2复合体基因组成各不相同，可借助抗原-抗体特异性反应完成分型鉴别。

单克隆抗体具备抗原识别特异性，可与对应靶抗原特异性结合。本方法采用针对H-2复合体K区、D区的特异性单克隆抗体，通过微量细胞毒试验，判定受试小鼠H-2复合体K区、D区基因型，确定其H-2单倍型。

5.2 设备与材料

5.2.1 单克隆抗体

纯化非标记的单克隆抗体H-2Db (27-11-13)、H-2Dd (34-5-8S)、H-2Dk (15-5-5.3)、H-2Kk (36-7-5)。

5.2.2 小牛血清

试验用小牛血清，满足细胞培养及微量细胞毒反应体系要求。

5.2.3 补体制备

选取2周龄~3周龄新西兰仔兔，采集动脉血，4℃条件下静置12 h，经3000 g离心15 min分离获得兔血清。筛选对小鼠脾细胞无致死毒性的兔血清，装后置于-70℃低温环境冷冻保存，作为试验补体备用。

5.2.4 PBS pH 7.2

Na ₂ HPO ₄ •12H ₂ O	1.27 g
KH ₂ PO ₄	0.21 g
NaCl	3.40 g

蒸馏水 定容至500 mL

5.2.5 Hank' s 液

NaCl	8.00 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.41 g
KCl	0.40 g
KH ₂ PO ₄	0.10 g
NaHCO ₃	1.27 g
葡萄糖	2.00 g
蒸馏水	定容至100 mL

5.2.6 伊红染液（6%）

曙红B（水溶性）Eosin B 0.60 g
蒸馏水 定容至10 mL

5.2.7 甲醛溶液（10%）

甲醛 1 mL
蒸馏水 定容至10 mL

5.2.8 离心机

最大离心力覆盖500 g~4000 g，可满足细胞离心、样本分离需求。

5.2.9 倒置显微镜

配备低倍观察视野，用于细胞活死状态判读与结果观察。

5.2.10 恒温箱

可控温（37℃），可稳定维持反应体系恒温孵育条件。

5.3 操作

5.3.1 脾细胞制备

5.3.1.1 取待检小鼠脾脏，剥离脂肪等附着物。

5.3.1.2 将脾脏置于盛有1 mL 10% 小牛血清（配制比例：9mL PBS 与 1 mL 小牛血清混合）的无菌平皿中，使用镊子充分撕碎脾脏组织。

5.3.1.3 将上述混合物转移至离心管中，再用1 mL 10%小牛血清洗涤平皿，洗涤液一并转移至同一离心管，静置15 min。

5.3.1.4 吸取上清液至另一离心管，弃去底部组织沉淀。

5.3.1.5 将收集的上清液，以3000 g 离心5 min

5.3.1.6 弃去上清液，保留沉淀。向沉淀中加入4.5 mL 蒸馏水，用吸管充分吹打混匀，自加入蒸馏水起精确计时，40 s 后立即加入0.5 mL Hank' s 液，再次用吸管充分吹打混匀，静置10 min。

5.3.1.7 吸取上清液至另一离心管，弃去底部沉淀团块，上清液以3000 g 离心5 min。

5.3.1.8 弃去上清液，保留沉淀。向沉淀中加入0.5 mL 20%小牛血清（配制比例：8 mL PBS 与 2 mL 小牛血清混合），混匀。

5.3.1.9 细胞记数，调整细胞终浓度至 $1 \times 10^6/\text{mL} \sim 5 \times 10^6/\text{mL}$ 。

5.3.2 细胞反应程序

5.3.2.1 选用 2.0 mL 离心管作为反应容器，每个受试品系同步设置空白对照管、补体对照管。

5.3.2.2 各反应管内加入 20 μL 混匀后的脾细胞悬液；试验管添加 20 μL 对应单克隆抗体，对照管替换添加 20 μL 20%小牛血清，充分混匀后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱孵育 15 min。

5.3.2.3 除空白对照管外，所有试管添加 30 μL 经 20%小牛血清 1:2 稀释的补体；空白对照管仅添加等量 20%小牛血清，全部试管置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴环境反应 30 min~40 min。

5.3.2.4 各管中加入 20 μL 伊红染色液工作液（6%伊红溶液用 20%小牛血清等倍稀释）置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保温 10 min。

5.3.2.5 每管加入 20 μL 10%甲醛固定液，混匀以稳定试验结果。

5.3.2.6 从每管中吸取 10 μL 细胞悬液滴加至细胞板上，在倒置显微镜下观察并记录实验结果。

5.3.3 结果评定

5.3.3.1 细胞形态区分

- a) 阳性死亡细胞：细胞体积膨大，伊红着色后无透光折光性；
- b) 阴性存活细胞：无伊红着色，细胞体积偏小，具备明显透光折光性。

5.3.3.2 计算公式

$$\text{细胞死亡率 (100)} = \frac{\text{死亡细胞数}}{\text{全部细胞数}} \times 100 \quad \text{细胞死亡率 (\%)} = \frac{\text{死亡细胞数}}{\text{全部细胞数}} \times 100$$

$$\text{细胞毒指数} = \frac{\text{实验组淋巴细胞死亡率 (100\%)} - \text{阴性对照组淋巴细胞死亡率 (100\%)}}{100 - \text{阴性对照组淋巴细胞死亡率 (100\%)}}$$

5.3.4 判断标准

若对应H-2单克隆抗体检测所得细胞毒指数大于0.70，则判定受试小鼠携带该抗体对应的H-2单倍型。常用近交系小鼠对应的H-2单倍型分型参照附录A执行。

附 录 A
(资料性)
近交系小鼠 H-2 单倍型

常用近交系小鼠H-2单倍型见表A. 1。

表 A. 1 常用近交系小鼠 H-2 单倍型

品系	H-2D	H-2K	H-2单倍型
129	b	b	b
615	k	k	k
C3H	k	k	k
C57BL/6	b	b	b
C57BL/10	b	b	b
FVB	b	b	b
TA1	b	b	b
TA2	b	b	b
T739	b	b	b
BALB/c	d	d	d
DBA/2	d	d	d
Scid	d	d	d