

应用免疫金电镜技术鉴定动物病毒方法的探讨

李 成 谷守林 郝桂玉 姜绍德 张 坦

(中国农科院哈尔滨兽医研究所, 哈尔滨150001)

提 要

本文提出了一种改进的免疫金电镜技术, 即, 离心法, 快速鉴定动物病毒。发现了离心法比混合法和滴附法较为理想, 非特异性反应较小, 灵敏度高, 可做为常规快速鉴定动物病毒方法。

关键词: 免疫金 电镜技术 轮状病毒 细小病毒

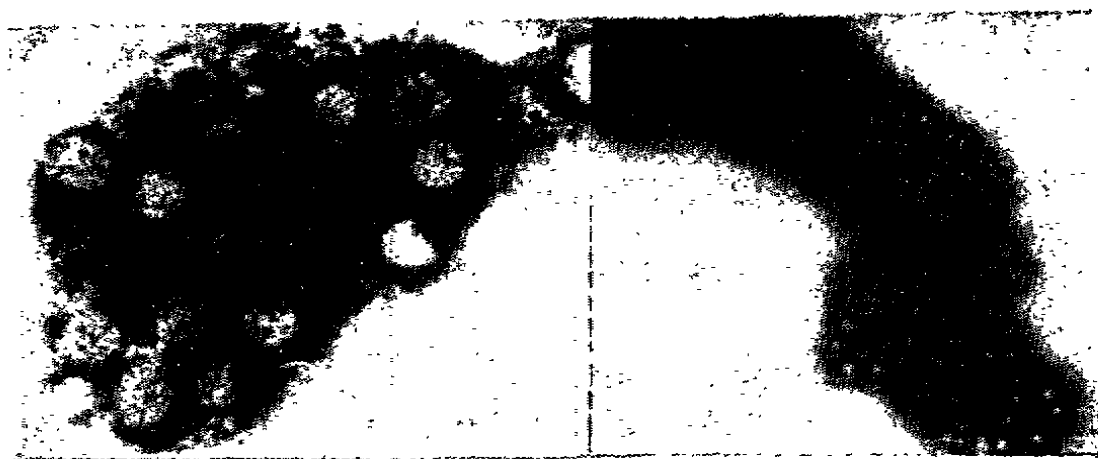
应用电镜技术直接对临床样品或细胞培养材料中动物病毒的检出和鉴定, 由于杂质的干扰, 是比较困难的。当向样品中加入特异性抗体使形成抗原抗体复合物时, 电镜下较容易观察到目的物, 但由于较难掌握合适的抗原、抗体结合浓度, 有时得不到满意结果, 为提高一般免疫电镜对病毒检测的特异性和敏感性, 国内外已常用胶体金免疫电镜方法⁽¹⁻⁷⁾, 但如果制样方法不当, 往往出现非特异性反应, 即非病毒粒子或非抗原物质上也附着金颗粒。为了消除此种现象, 本试验利用猪轮状病毒和猪细小病毒进行了多次比较试验, 认为离心法效果满意, 介绍如下。

本试验应用的材料为含轮状病毒的猪腹泻粪便, 兔抗猪轮状病毒高免血清(由王玉春副研究员惠赠); 接种猪细小病毒的猪胎仔猪肾细胞培养物及猪细小病毒高免血清(由王润芝副研究员惠赠); 葡萄球菌蛋白 A 包被的胶体金悬液(PAG), 粒径约 5 nm(自制)⁽⁸⁾。

本试验应用三种方法: 方法 1 (混合法), 取待检样品、特异性高免血清、PAG 各 50 μ l 混合, 置 37°C 温箱中作用 1 小时, 再置 4°C 冰箱中过夜(有时可省此步骤), 作用后的混合液滴附在蜡盘上, 把碳-福尔马膜铜网, 膜面向下放在液滴上, 1 分钟后取下铜网, 用滤纸吸去多余液, pH 6.5 2% 磷钨酸液染色后, 电镜检查; 方法 2 (滴附法), (1) 将 10 μ l 病毒液滴附在蜡盘上, 把碳-福尔马膜铜网膜面向下置于液滴上, 约 1 分钟后用滤纸吸去多余病毒液, (2) 10 μ l 高免血清 (1:10 \times) 滴附在蜡盘上, 把带病毒液的铜网置于该液滴上, 置 37°C 温箱中作用 30 分钟, 用滤纸吸去多余的血清液, (3) 用蒸馏水以液滴方式洗二次, (4) 10 μ l PAG 滴附在蜡盘上, 再将经上述步骤处理的铜网置于该液滴上, 约 1 分钟后, 用滤纸吸去多余的 PAG 液, (5) 用蒸馏水以液滴

本文于 1980 年元月 22 日收到。

方式洗一次, 然后用滤纸吸去多余液体, (6) 用 pH6.52% 磷钨酸负染 1 分钟左右, 滤纸吸干后镜检, 方法 3 (离心法), (1) 病毒液 $50\mu\text{l}$ 和相应的高免血清 $50\mu\text{l}$ 混合, 混匀, (2) 置 37°C 温箱中作用 1 小时, (3) 蒸馏水以充满管的方式高速离心, 速率为 10000r/m , 离心 30 分钟, 弃上清, 目的是除去未结合的游离的抗原或抗体成分, (4) 取其沉淀物, 用蒸馏水 $100\mu\text{l}$ 将其悬浮, (5) 加 $50\mu\text{l}$ PAG 液混合, 混匀, (6) 置 37°C 温箱中作用 30 分钟, (7) 用蒸馏水以充满管的方式高速离心 30 分钟, (8) 弃上清, 取其沉淀物, 用 $100\mu\text{l}$ 蒸馏水悬浮, 负染后观察。



1 胶体金标记的猪轮状病毒

(放大: $135,000\times$)

图 1: 猪腹泻粪便中的轮状病毒, 在病毒粒子表面, 尤其是在破碎了的粒子表面有许多免疫金颗粒 (粗箭头) 细箭头指的是带有一圈金颗粒的病毒粒子

Fig. 1: Rotaviruses in faecal sample of a diarrhoeatic pig. Many immunogold granules on the virus particles, especially on the surfaces of the broken particles (thick arrow).

2 胶体金标记的猪细小病毒

图 2: 猪肾初代细胞培养物上的细小病毒, 在细小病毒聚集体表面及周围有许多的免疫金颗粒。

Fig. 2: Parvoviruses in the pig kidney primally cell culture. Many immunogold granules on the surface and in periphery of the aggregate of parvovirus particles

本试验得出, 应用方法三所制备的免疫金样品, 经电镜观察发现了在单个病毒粒子或集堆的病毒粒子表面和周围有许多金颗粒附着, 金颗粒呈现出非常强的反差, 在被金颗粒围绕的结构, 清楚地表明了是病毒粒子或抗原物质 (图 1—2)。从图 1 中可以观察到破碎的病毒粒子表面附有大量的金颗粒, 这说明病毒破碎后, 表现出较强抗原性。

应用方法 2 和方法 1 所制备的样品, 经电镜观察, 发现存在一定非特异性反应, 也就是在非病毒结构或碳-福尔马膜空白处同样发现了一定量的金颗粒。不过方法二比方法一的非特异性反应较小些。

以上结果, 我们认为方法 3 所制备的样品特异性比较高, 也就是说应该标记金颗粒

的地方都有金颗粒附着, 不应该标记的地方基本看不到金颗粒存在。方法3是通过两次高速离心的方法去掉多余的反应物。第一次高速离心是除去抗原抗体结合后, 没有参与形成复合物而过剩的抗原或抗体物质, 因为这些过剩的抗原或抗体如果游离在样品中, 当加入PAG时, 同样也会与其反应, 产生非常特异性标记。通过每分钟1万转离心, 只能把抗原抗体复合物离心下来, 而游离的抗原或抗体一般沉淀不下来的, 仍存在于上清液中被弃掉。第二次高速离心是除去多余的PAG, 因为没有参与形成复合物的PAG混在样品中也会产生非特殊性反应, 铜网膜对一切蛋白质都有一定吸附能力, 如果制备后的样品中, 既没有游离抗原或抗体, 也没有游离的PAG, 全都是特异性结合的抗原抗体-PAG结合物, 就不会担心有其他非特异性物质干扰。

方法2比方法1非特异性反应小, 这是因为方法2在操作中也有两次用蒸馏水洗, 洗去过剩的反应物, 但不会全部洗掉, 因为铜网膜对这些物质还有一定的吸附力, 只能是洗掉一部分而已, 方法1, 是把所有的反应物统统放在一起, 因各反应物合适的反应量很难掌握, 所以就较容易出现某一反应物不足或过剩, 这是产生非特异性反应的主要因素。

参 考 文 献

- [1] Lin, N.S., 1984, *J. of Virological Methods*, 8: 181-190.
- [2] Louro, D. and Lesemann, D-E., 1984 *J. Virological Methods*, 9: 107-122.
- [3] Hopley, J.E.A. and Doane, F.W. 1985, *J. Virological Methods*, 12: 135-147.
- [4] Kjeldsbegr, E., 1986, *J. Virological Methods*, 13: 207-214.
- [5] Patterse, S. and Verduin, B.J.M., 1987, *Arch Virol* 97: 1-36
- [6] Hyatt, A.D., Mcphee, D.A. and wyite, J.R., 1988, *J. Virological Methods*, 19: 23-32.
- [7] El-Ghorr, A.A., Snodgrass, D.R. and Scott, F.M.M., 1988, *J. Virological Methods*, 19: 215-224.
- [8] 李成, 1987, 中医畜禽传染病, 5: 59-61.

Study on the Methods for Rapid Identification of Animal Viruses by Immunogold Electron Microscopy

Li Cheng

(Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Haerbin 150001)

This paper presents a developed immunogold electron microscopic technique, i.e. the centrifugal method for rapid identification of animal viruses. The centrifugal method was found to be more satisfactory than the mixing and drop methods with less nonspecific reactions and high sensitivity for routine rapid identification of animal viruses.

Key words: Immunogold electron microscopic technique Rotavirus Parovirus