

375-377

绵羊进行性肺炎病毒荧光抗体的 制备及其对病毒感染细胞的检测

丁恩雨¹ 相文华²

¹(复旦大学生命科学学院, 上海 200433)

²(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 哈尔滨 150001)

S852.43

S858.265.3

关键词 绵羊进行性肺炎病毒, 荧光抗体, 间接免疫荧光法 制备, 病毒病;

绵羊进行性肺炎(OPP)是慢性进行性传染病,以损害绵羊多种器官为特征,其病原为反转录病毒科慢病毒亚科的成员^[1]。目前国外对本病的研究,特别是有关诊断方面的报道甚多^[2,3],而我国对 OPP 的研究尚处于起步阶段。本文旨在应用制备的 OPP 荧光抗体,按间接免疫荧光法(间接 IFA)来检测 OPPV 感染绵羊胎肺细胞后的变化情况,为进一步阐明 OPPV 及其它慢病毒的感染机理提供依据。

材料和方法

1 病毒与阳性血清

OPPV(WLC-1 株系美国华盛顿州立大学惠赠)在绵羊胎肺细胞上进行增殖。OPP 阳性血清系中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提供。

2 荧光抗体的制备

2.1 健康绵羊血清 IgG 的提取 按文献^[4,5]分别进行绵羊血清 IgG 的粗提与层析法提纯。

2.2 兔抗绵羊 IgG 的制备 按相文华等方法^[6]制备兔抗绵羊 IgG,其提取方法与绵羊 IgG 的提取方法相同。

2.3 荧光抗体的标记 在内含磁力搅拌棒的三角烧瓶中,加入 12ml 兔抗绵羊 IgG(50mg/ml)及 10.95ml 生理盐水,置 4℃ 冰箱内缓慢搅拌,加入 2ml 0.1mol/L pH9.5 碳酸盐缓冲液。再用 2.05ml 0.1mol/L pH9.5 碳酸盐缓冲液溶解异硫氰酸荧光素(FITC, E. Merck, Darmstadt),并将溶解的 FITC 滴入三角烧瓶内,4℃ 缓慢搅拌 6 小时,取出过 Sephadex G-50 柱,浓缩后再过 DEAE-52 柱,收集并浓缩,经蛋白折射仪测定其浓度为 10mg/ml(以上,置 -20℃ 冰箱中备用。

3 间接 IFA 试验程序

3.1 抗原标本的制备 收集 OPPV 接种绵羊胎肺细胞后不同时间的培养物飞片及未接毒培养物飞片,用 0.01 mol/L pH7.4 PBS 冲洗,吹干,丙酮固定 5 分钟后备用。

3.2 染色及镜检 将 6 倍稀释的 OPP 阳性血清滴加在抗原标本片和对照标本片上,置湿盒内于 37℃ 孵育 45 分钟。取出用 0.01mol/L pH7.4 PBS 冲洗三次,每次 15 分钟。再用 6 倍稀释的荧光抗体(FITC 标记的兔抗绵羊 IgG)和少量牛 RB200 滴加于标本片上,又置湿盒内 37℃ 孵育 45 分钟,冲洗方法同前,并用缓冲甘油(9 份甘油 + 1 份 PBS)封片,荧光显微镜观察。

结果与讨论

1 荧光抗体的制备

兔抗绵羊 IgG 荧光素结合物经一系列纯化并测定其蛋白浓度约为 40mg/ml, F/P 比值为 1.7, 符合试验标准。

2 OPPV 接种绵羊胎肺细胞后不同时间的检测

本试验采用间接 IFA 跟踪了 OPPV 接种绵羊胎肺细胞后的变化情况。共选择了接毒后 24 小时内每间隔 2 小时、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、7 天、8 天和 9 天的病毒细胞培养物飞片以及未接毒对照细胞飞片。结果表明未接毒对照细胞不呈现荧光反应(图 1A); OPPV 接种绵羊胎肺细胞 18 小时内未出现特异性荧光反应, 说明 OPPV 侵入细胞之前已经脱去衣壳或侵入细胞后很快脱去衣壳; 而接毒后 18 小时开始出现荧光反应, 且大部分存在于核膜上, 可能系 OPPV 的 cDNA 整合于宿主细胞 DNA 上, 并在核糖体上由其 mRNA 转译成病毒结构蛋白; 20 小时除在核膜上出现荧光外, 在其胞浆中亦出现少量荧光, 说明病毒结构蛋白已在胞浆中表达; 以后荧光反应逐渐增强, 6 天的荧光反应强度达到高峰, 且胞膜上亦出现荧光反应(图 1B); 7 天后大部分感染细胞的荧光反应逐渐减弱。

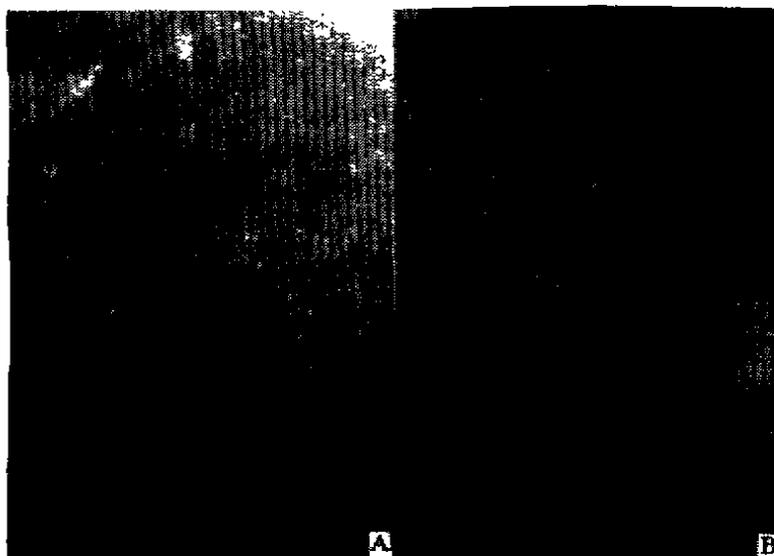


图 1A 未接毒绵羊胎肺细胞培养物不呈现荧光反应(10×20)

Fig 1 A The fluorescence reaction did not appear when sheep foetal lung cell cultures were not inoculated by OPPV (10×20 times)

图 1B OPPV 接种绵羊胎肺细胞后 6 天的荧光反应达到高峰(20×20)

Fig 1 B The degree of the fluorescence reaction reached a high peak in 6 days postinfection (20×20 times)

参 考 文 献

- 1 范存军. 绵羊进行性肺炎与山羊关节炎脑炎. 中国畜牧传染病, 1990; 3:59~61

- 2 Houwers D J, Schaake J. An improved ELISA for the detection of antibodies to ovine and caprine lentivirus, employing monoclonal antibodies in a one-step assay. *Journal of Immunological Methods*, 1987, 98(1), 151~154
- 3 Zanoni R. Caprine arthritis-encephalitis (CAE) and maedi-visna viruses detected by the polymerase chain reaction (PCR). *Vet Microbiol*, 1990, 23, 329
- 4 北京医学院微生物学教研室主编. 实验免疫学. 北京, 人民卫生出版社, 1980: 30~32
- 5 殷震主编. 动物病毒学. 北京: 科学出版社, 1985, 382
- 6 相文华、丁恩雨、吕晓玲, 等. 山羊关节炎脑炎荧光抗体制备及初步应用. *中国畜牧传染病*, 1993, 4, 34~36

The Preparation of the Fluorescence Antibody of Ovine Progressive Pneumonia Virus and the Detection of the Cell Infected by the Virus

Ding Enyu¹ Xiang Wenhua²

¹(*School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433*)

²(*Harbin Institute of Veterinary Medicine, CAAS, Harbin 150001*)

The changes of sheep foetal lung cells infected by Ovine Progressive Pneumonia Virus (OPPV) were observed by indirect immunofluorescence assay (IFA) and with the prepared fluorescence antibody of OPPV. The result indicated that the fluorescence reaction initially appeared in 18 hours postinfection. The degree of the fluorescence reaction reached a high peak in 6 days postinfection and subsequently decreased.

Key words Ovine progressive pneumonia virus; Fluorescence antibody, Indirect immunofluorescence assay