

鱼呼肠孤病毒(FRV)抗血清的 制备及其应用

闵淑琴 洪世雯 蔡宜叔

(中国科学院武汉病毒研究所)

提要 在 FRV 的分离和纯化基础上,本文介绍了制备 FRV 抗血清的几种方法。并采用不连续对流免疫电泳法(DCIE)和酶联免疫吸附试验(ELISA)进行 FRV 诊断学研究结果,同时对这两种方法检测 FRV 的灵敏度作了比较。

主题词 鱼呼肠孤病毒、草鱼出血病、抗血清

草鱼出血病是一种严重的鱼类病毒病,造成草鱼大批死亡。研究该病的防治对于我国淡水渔业的发展具有十分重要的意义。目前已有一些单位采用粗制疫苗进行预防^[1],并开始细胞疫苗等方面的防治研究工作。但迄今为止,尚未建立灵敏、可靠的血清学诊断方法来预测该病的检测和预防效果。我所曾报道了鱼呼肠孤病毒(简称 FRV)为该病的病原^[2],建立了稳定的提纯 FRV 的方法。并在此基础上,成功地制备出几种 FRV 抗血清,对不连续对流免疫电泳法(DCIE)和酶联免疫吸附试验(ELISA)诊断 FRV 作了研究,比较了这两种方法对检测 FRV 的灵敏度。本文介绍这方面的研究结果。

材 料 和 方 法

1. FRV 抗原及其纯化 将 FV—836 毒株^[3]感染健康草鱼种,取感染后发病的草鱼组织按文献[2]的方法提纯。提纯后的抗原样品在电镜下观察可见大量病毒粒子。紫外分光光度计测定并使 $OD_{280} = 2.74$ 。

2. 兔 FRV 抗血清的制备 选用 2 公斤以上健康家兔,采用腮淋巴结免疫^[4]为基础免疫途径,即在兔腮窝处割一小切口,可见一淡红色、黄豆粒大小的腮淋巴结,将 0.2ml 提纯的抗原和等量的完全福氏佐剂乳化液注射到淋巴结内,缝合皮肤,完成基础免疫。在基础免疫后第 14 天进行第一次加强免疫,即于两侧鼠蹊皮下各注射 0.2ml 提纯抗原和等量的不完全福氏佐剂乳化液,第 21 天进行第二次加强免疫,在两侧臀部肌肉各注射 0.2ml 提纯抗原和等量的不完全福氏佐剂乳化液。9 天后胫静脉采血,得到免疫兔抗血清。用正常草鱼组织经同样提纯处理后的材料做为吸附液,于 37°C 保温 1 小时后,于 4000rpm 条件下离心 30 分钟,去沉淀后得到兔 FRV 抗血清。

3. 鱼 FRV 抗血清的制备 将 FV—836 感染的病鱼组织在捣碎器内于 8000rpm 条件下搅动 15 分钟,制成的匀浆用适量磷酸缓冲生理盐水(PBS)稀释后,用 4000rpm 速度离心 20 分钟,去掉组织碎片及其杂质,加入青链霉素,于 37°C 保温 1 小时。将 0.2ml

此病毒样品从腹腔处注射到健康草鱼中,在28°C饲养,取15天后仍存活的草鱼血清,获得鱼FRV抗血清。

4. 鼠FRV抗血清的制备 选12周龄BALB/C小白鼠,基础免疫于腹腔内两侧各注射0.2ml提纯抗原和等量的完全福氏佐剂乳化液。在基础免疫后第21天和第30天分别进行第一、二次加强免疫,均于两侧腹腔内各注射0.2ml提纯抗原样品。7天后采血,用ELISA法检测抗体。

5. 免疫复合物的电镜观察 将制备出的兔FRV抗血清与FRV样品按1:10混合后,于37°C保温1小时,于Eppendorf离心机离心10分钟后,弃去上清液,沉淀溶于少量重蒸馏水中,滴于碳膜覆盖的火棉胶膜铜网上。用2%磷钨酸,pH6.9负染色,在JEM-100C电子显微镜下观察。

6. 兔抗FRV IgG的提纯 免疫兔FRV血清用中性饱和硫酸铵沉淀后,经DEAE-Sephadex A50柱层析,得到纯化的抗FRV IgG,经聚丙烯酰胺凝胶电泳及醋酸纤维素薄膜电泳检测,在r区呈现一条蛋白质区带。紫外分光光度计测定其蛋白含量为2.697mg/ml。

7. 辣根过氧化物酶(HRP)标记兔抗FRV IgG 按郭春祥等人的改良过碘酸盐法^[9]进行。所用HRP为上海生化所生产,R·Z=2.5-3。

8. 不连续对流免疫电泳法(DCIE) 用0.015M巴比妥钠-盐酸缓冲液(pH8.4)配制0.75%琼脂,电泳槽缓冲液为0.075M巴比妥钠-盐酸缓冲液(pH8.4),电泳电压为每厘米5伏左右,60分钟观察结果。

9. 酶联免疫吸附试验(ELISA) 按常规ELISA双抗体夹心法^[6]检测FRV抗原。采用上海塑料三厂生产的40孔聚丙烯微量反应板,包被抗体为纯化的兔抗FRV IgG。通过棋盘滴定选择包被抗体浓度为2 μ g/孔,HRP-FRV结合物稀释度为1:100,底物采用磷苯二胺。肉眼观察结果。

按常规ELISA间接法^[6]检测FRV抗体。采用上述微量反应板。经棋盘滴定选择吸附抗原浓度为1:90稀释度的FRV提纯抗原,酶标结合物采用北京生物制品所生产的辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠BALB/C结合物,底物采用磷苯二胺。肉眼观察结果。

结果和讨论

1. FRV抗血清

制备成的兔免疫血清经正常鱼材料吸收后,得到兔FRV抗血清,经DCIE法检测,与FRV抗原呈现一条沉淀线,与正常鱼比较无血清学反应,其抗体滴度为1:32;而采集的鱼血清,其FRV抗体的DCIE滴度为1:2左右;鼠FRV抗体经ELISA法检测呈阳性反应(++).

2. 免疫复合物的电镜观察

在电镜下可观察到聚集成丛的FRV,典型结果如图1所示。这个结果表明,我们所制备的兔FRV抗血清与FRV抗原产生免疫反应,形成抗原抗体复合物。这种血清为

FRV 特异性免疫血清。

3. DCIE 法检测 FRV 抗原及鱼体产生的 FRV 抗体

表 1 列出用 DCIE 法检测 FRV 抗原的结果。所用抗体为制备的兔 FRV 抗血清, 被测抗原为感染 FRV 的病鱼组织 1:4PBS 稀释液(称原始病毒样品)及提纯后的 FRV 样品。由表 1 可以看出, DCIE 法只能测出提纯浓缩后的样品中的 FRV, 而不能测出浓度较低的原始病毒样品中的 FRV 抗原。其检测灵敏度较低。

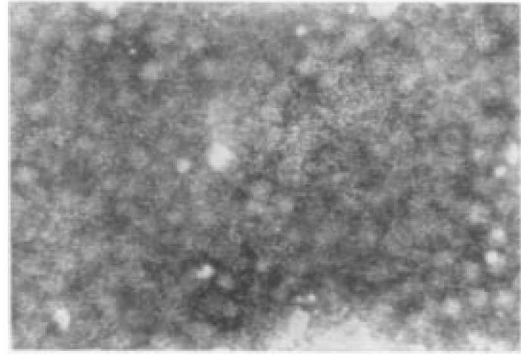


图 1. FPV 免疫复合物电镜照片。
放大 80,000 倍

Fig. 1 The electron microscope photograph of immunity compound, x80,000.

表 1 DCIE 法检测 FRV 抗原的结果

Table 1 The Detection of FRV antigen with DCIE method

样品处理 Specimen	样品编号 NO.	1	2	3	4	5	6	7
原始病毒样品 Crude		-	-	-	-	-	-	-
提纯样品 Purification		+	+	+	+	+	+	+

表 2 列出采用提纯的 FRV 样品为抗原, 用 DCIE 法检测鱼 FRV 抗体的实验结果。6 份鱼血清样品中, 5 份为抗体阳性, 其中 3 份抗体滴度为 1:1, 2 份滴度为 1:2。尽管该法灵敏度不太高, 但仍可作为检测鱼体中 FRV 抗体的一种简易、快速、准确的诊断方法。

表 2 DCIE 法检测 FRV 抗体的结果

Table 2 Detection of FRV antibody with DCIE method

稀释度 dilution	样品编号 NO.	1	2	3	4	5	6
原液 (original solution)		+	+	+	-	+	+
1:2		+	+	-	-	-	-
1:4		-	-	-	-	-	-

4. ELISA 法检测 FRV 抗原

表 3 列出采用 ELISA 双抗体夹心法及 DCIE 法检测 16 份草鱼组织材料的实验结果。样品 1—9 号为典型草鱼出血病病鱼材料, 10—14 号为非典型草鱼出血病的鱼材料, 15—16 号为典型草鱼出血病病鱼材料经超速离心后除去 FRV 的上清液。牛血清和 PBS

表3 ELISA 法检测 FRV 抗原的结果

Table 3 The Detection of FRV antigen with ELISA method

检测方法 methods	样品编号 NO.																牛血清	PBS
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
ELISA	+++	+	++	+	+	+	+	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
DCIE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

为阴性对照。由表3可以看出,采用 DCIE 法检测,9份典型草鱼出血病样品均为阴性。而用 ELISA 法检测,9份典型草鱼出血病样品均为阳性,而5份非典型草鱼出血病样品均为阴性,2份超离心除去 FRV 后的上清液也均为阴性。说明所建立的 ELISA 法可作为 FRV 的特异性诊断方法。

5. DCIE 法与 ELISA 法检测 FRV 抗原灵敏度的比较

将提纯浓缩的 FRV 抗原样品做一系列稀释,分别采用 DCIE 法和 ELISA 法检测其抗原性。1:50 稀释度的正常草鱼血清和 PBS 为阴性对照。结果列于表4。由表4可见,提纯的抗原样品用 DCIE 法检测,滴度为 1:1,而用 ELISA 法检测,滴度为 1:500。由此可见,ELISA 法比 DCIE 法的灵敏度至少高 400 倍,可以做为灵敏、准确、特异的检测 FRV 的血清学方法,并可用于其早期诊断。

表4 DCIE 法和 ELISA 法检测 FRV 灵敏度的比较

Table 4 The comparison between DCIE and ELISA METHODS

检测方法 methods	FRV 稀释度 dilution	原液 Original solution	1/2	1/4	1/80	1/100	1/200	1/400	1/500	1/600	1/1000	1/2000	1/50 正常 草鱼血清 1/50 normal serum	PBS
	DCIE		+	-	-									
ELISA					+++	+++	++	++	++	±	-	-		

6. ELISA 法检测鼠 FRV 抗体

为制备 FRV 单克隆抗体,我们免疫了 BALB/C 小鼠,并建立了 ELISA 间接法检测鼠 FRV 抗体的方法。用 1:10 稀释的正常鼠和免疫鼠血清做为待测抗体样品,牛血清和 PBS 为阴性对照。表5列出检测结果。免疫鼠呈抗体阳性反应,正常鼠呈抗体阴性反应。这一方法的建立可为进一步制备 FRV 单克隆抗体提纯必要的检测手段。

表5 ELISA 法检测鼠 FRV 抗体的结果

Table 5 The outcome of test for FRV antibody of mouse with ELISA

样品 Specimen	正常鼠血清 1:10 normal mouse serum	免疫鼠血清 1:10 Immunity mouse serum	牛血清 BSA	PBS
结果 outcome	-	++	-	-

采用 DCIE 法可以检测出草鱼体内产生的 FRV 抗体,因此,该法可用于预测草鱼出血病的疫苗预防效果,但其灵敏度较低。如将本文所述 ELISA 法稍做改变,即可用于检

测草鱼体内微量 FRV 抗体的滴度,从而定量评价疫苗对该病的预防效果,这是目前草鱼出血病防治研究工作中急待解决的问题。

参 考 文 献

- [1] 陈燕桑等,1985 年亚洲淡水养殖学术讨论会论文集(即将出版)。
- [2] 中国科学院武汉病毒研究所,中国水产科学研究院长江水产研究所沙市分所草鱼出血病研究协作组,淡水渔业,1984 年,第 4 期,7—9 页。
- [3] 洪世雯、蔡宜权等,1985 年亚洲淡水养殖学术讨论会论文集(同上)。
- [4] 蔡宜权等,1974,家兔腮淋巴免疫制备乙型肝炎抗原抗血清。科学通报,19(9):428—430。
- [5] 郭春祥等,1983。介绍一种简单、快速、高效的辣根过氧化物酶标记抗体的过碘酸钠法。上海免疫学杂志,2(2):97—100。
- [6] 戴华生等,1983。新实验病毒学,439—441。中国学术出版社。

THE PREPARATION AND APPLICATION OF SEVERAL ANTISERA AGAINST FISH REOVIRIS(FRV)

Min Shuqin, Hong Shiwen and Cai Yiquan

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica)

ABSTRACT A few antisera against fish reovirus(FRV) were prepared by our laboratory. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and discounter immunoelectrophoresis (DCIE) were developed to do the serological diagnosis of FRV infection in grass carp, using these antisera. The DCIE was compared with ELISA for detection of FRV. The ELISA was found to be at least 400 times more sensitive than the DCIE, and as a highly sensitive, rapid and specific method for early diagnosis of FRV.

KEY WORDS Fish reovirus, FRV, Hemorrhage disease, Antisera.